

Aus dem Zentrum für Klinische
Chemie, Immunologie und Humangenetik

Untersuchungen von Kapillarschädigungen
durch Sauerstoffmangel und Endotoxine am
Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin

der

Justus Liebig - Universität Gießen

Vorgelegt von

VOLKER ASCHOFF

aus Haiger

GIESSEN 1974

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie , Immunologie und Humangenetik

Untersuchungen von Kapillarschädigungen durch Sauerstoffmangel und Endotoxine am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Bereiches Humanmedizin
der
Justus Liebig - Universität Gießen

Vorgelegt von
Volker Aschoff
aus Haiger.

GIESSEN 1974



Dekan : Prof. Dr. D. Ringleb
Referent : Prof. Dr. L. Ròka
Korreferent : Prof. Dr. M. Frimmer



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Für die Überlassung des Themas und die stete Bereitschaft zur Diskussion auftretender Probleme gilt mein aufrichtiger Dank meinem verehrten Lehrer Herrn Prof.Dr. Ladislaus Róka.

Des weiteren danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frl. H. Betz und Frl. C. Passarge für ihre Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teiles.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse am Institut für Dokumentation und Statistik der Justus-Liebig-Universität Gießen standen mir die Herren Glettler und Höbel stets in dankenswerter Weise mit Rat und Tat zur Seite.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung

Theoretische Voraussetzungen

Einleitung

Fragestellung und Zielsetzung

Material und Methodik

Tiermaterial

Operationstechnik

Apparatur

Angaben zur Perfusion

Perfusionsmedium

Herstellung des Endotoxinpräparates

Herstellung des Endotoxin-Plasmas

Meßmethodik

Glukose

Gallenmengen

BSP-Clearance

Säureproduktion

Kalium-Austritt

LDH-, GPT-, GOT-Austritt

GLDH-Austritt

Evans-Blue-Extinktionen

Verfahren der statistischen Auswertung

Modell der partiell hierarchischen Varianzanalyse

F-Test

Scheffé-Test

1. Versuchsreihe (FC-75 als Sauerstoffträger)

Einleitung. Zielsetzung

Versuchsplanung

Ergebnisse

Glukose

Gallenmenge

BSP-Clearance

Säureproduktion

Kalium- Austritt

LDH-Austritt

GPT-Austritt

GOT-Austritt

GLDH-Austritt

Evans-Blue-Extinktionen

Zusammenfassende Beurteilung

Schlußfolgerung

Anhang zur 1. Versuchsreihe

2. Versuchsreihe (Abbruch der Sauerstoffversorgung)

Einleitung. Zielsetzung

Ergebnisse

Glukose
Gallenmenge
BSP-Clearance
Kalium-Austritt
Enzyme (LDH, GPT, GOT)

Zusammenfassung der Befunde. Folgerungen

Diskussion

Anhang zur 2. Versuchsreihe

3. Versuchsreihe (Zugabe eines Endotoxinpräparates)

Ergebnisse

Glukose
Gallenmenge
BSP-Clearance
NaOH-Verbrauch
Kalium-Austritt
Enzyme (LDH, GPT, GOT)
G1DH-Austritt
Evans-Blue

Zusammenfassung

Auswertung mit Hilfe des Modells der partiell
hierarchischen Varianzanalyse (VA) .

VA mit 4 Faktoren
VA mit 3 Faktoren

Ergebnisse

Zeitlicher Verlauf
Tuscheeinwirkungen
Wechselwirkungen zw, Endotoxingruppen und
Tuscheapplikation
Wechselbeziehungen zw. zeitl. Verlauf u. Endotoxin-
konz. sowie zw. zeitl. Verlauf,
Endotoxinkonz.u.Tuscheapplikation
Endotoxinwirkung
Wechselbeziehung zwischen zeitlichem Verlauf und
Endotoxingruppe

Anhang zur 3. Versuchsreihe

Anhang zur statistischen Auswertung

Literaturverzeichnis

Lebenslauf

ZUSAMMENFASSUNG

Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde versucht,

1. durch die Verwendung von emulgiertem Fluorkohlenwasserstoff (FC-75) die Sauerstoffversorgung zu steuern,
2. durch Abbruch der Sauerstoffzufuhr unterschiedliche Schädigungen am isolierten Organ zu erreichen,
3. durch die Zugabe einer Endotoxinpräparation zum Perfusat über eine Kapillarschädigung eine Parenchymbeeinträchtigung zu erreichen. Bei einem Teil dieser Versuche wurde vorher das RES durch Tuscheinjektion blockiert.

Durch die Änderung der Sauerstoffversorgung sollte ein gut reproduzierbares Modell für eine Leberschädigung durch Hypoxie und Anoxie geschaffen werden als Bezug für die Hauptversuche mit Endotoxinapplikation zum Perfusionsmedium.

Beide Methoden erfüllten jedoch nicht den erhofften Zweck :

Fluorocarbonzusätze verschiedener Konzentrationen zum Perfusionsmedium führten nicht zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung.

Auch der Abbruch der Sauerstoffversorgung unterschiedlich lange nach Perfusionsbeginn zeigte nur partiell die erwartete Gewebsschädigung.

Die i.v. Applikation von 0,7 ml 1:5 verdünnter Tusche, 45 min vor Beginn der Hepatektomie injiziert, bewirkt bei erhaltener Funktionsfähigkeit des Leberparenchyms eine raschere Strukturänderung der Leberzellen als bei perfundierten Lebern ohne vorherige Tuscheinjektion.

Die Zugabe unterschiedlicher Mengen einer in Krebs-Henseleit-Puffer gelösten Endotoxinpräparation 1 std. nach Perfusionsbeginn erbrachte folgende Ergebnisse :

1. Der Zusatz von weniger als 0,25 mg Endotoxin pro 100 ml Perfusionsmedium ist ohne nachweisbare Wirkung.
2. Die Zugabe von mehr als 0,25 mg Endotoxin macht schädigende Effekte wahrscheinlicher.
3. Eine Beziehung zwischen Tuscheblockade des RES und dem zugegebenen Endotoxinpräparat besteht bei Dosen bis einschließlich 0,25 mg Endotoxin nicht.
4. Oberhalb von 0,25 mg Endotoxinzugabe treten bei den tuschepräparierten Lebern die beobachteten Schädigungen häufiger auf als bei Versuchen ohne Tusche.

Der Funktionszustand der Leber wurde verfolgt an halbstündigen Bestimmungen der Glukosekonzentration im Perfusat, der sezernierten Gallenmenge, der BSP-Clearance und der Säureproduktion. Zellschädigungen wurden durch den Austritt von Kalium, LDH, GPT und GOT sowie G1DH nachgewiesen.

Im Modell der partiell hierarchischen Varianzanalyse wurden die genannten Parameter auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit verschieden hoher Endotoxinzugabe überprüft.

A. Theoretische Voraussetzungen

I. Einleitung

Endotoxine sind proteingebundene Lipopolysaccharide, die sich als Bestandteil der äußeren Membran über dem Mureinnetz gramnegativer Bakterien befinden (1,2). Sie sind verantwortlich für zahlreiche Manifestationen enterobakterieller Erkrankungen wie z.B. für Fieber, Schock und Tod. Durch verschiedene Methoden (3,4) läßt sich aus dieser äußeren Membran das Lipopolysaccharid (LPS) als schollig aggregiertes Pulver mit einem Molekulargewicht von ca. 10 Millionen isolieren.

Die chemische Struktur des Endotoxinmoleküls besteht aus 3 Bauteilen unterschiedlicher Struktur und Funktion , die als Region I, II, und III bezeichnet werden :

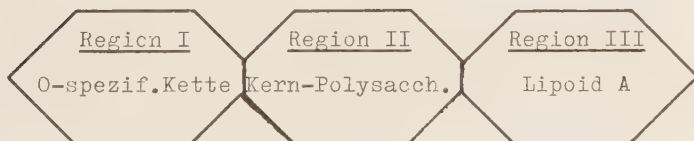


Abb. 1 : Bauschema des Lipopolysaccharid - Moleküls
(LÜDERITZ) (42) .

Die spezie-spezifische Region I ist Träger der serologischen Spezifität (O-Spezifität) der Bakterien. Ihre serologischen Determinanten sind großenteils bekannt (5,6,7,8) .Sie besteht im Normalfall aus

8 - 11 kettenartig aneinandergereihten identischen Oligosacchariden (repeating units), die aus unterschiedlich vielen Zuckern aufgebaut sind (9). Die Region I spielt für das endotoxische Geschehen keine Rolle. Es gibt bakterielle Defektmutanten (R-Mutanten), deren Endotoxine trotz fehlender Region I voll wirksam sind (10).

Auch die Region II (Kern- oder core-Polysaccharid) kann auf Grund solcher Enzymdefekte stark verkürzt sein. Sie besteht im Regelfall bei Salmonellen aus einem verzweigten Decasaccharid und ist charakteristisch für die jeweilige Bakteriengattung. Sie verbindet Region I mit Region III. Der Polysaccharidanteil der Regionen I und II dient als Lösungsvermittler, so daß der hydrophobe Anteil (Lipoid A) des Endotoxinmoleküls auch im wässrigen Milieu seine optimale Wirksamkeit entfalten kann (11).

Die Region III besteht aus Lipoid A, das kovalent an das Polysaccharid der Region II gebunden ist (12-16). Wie WESTPHAL und LÜDERITZ schon 1954 (12) vermuteten und wie RIETSCHEL 1971 beweisen konnte (11), ist dieser Teil des Moleküls der alleinige Träger der endotoxischen Wirksamkeit. Daher konnten wir bei unseren Versuchen auf das vollständige LPS verzichten. Stattdessen verwandten wir das LPS der Defektmutante S.minnesota R 595. Es handelt sich hierbei lediglich um ein 2-Keto-3-desoxy-octonsäure (KDO) Trisaccharid mit kovalent gebundenem Lipoid A der folgenden Struktur (17,18,19) : S. Abb. 2 .

Trotz Fehlens der O-spezifischen Kette (Region I) und trotz eines auf ein KDO-Trisaccharid verkürzten Basal-Polysaccharides (Region II) sind hier nach LÜDERITZ, KIM, KASAI et al. die endotoxischen Wirkungen voll erhalten (20,21,22).

Im Zentrum dieses Phospholipides steht ein β - β -1,6 verknüpftes D-Glukosamindisaccharid (17). Die freien Hydroxylgruppen sind mit höheren gesättigten

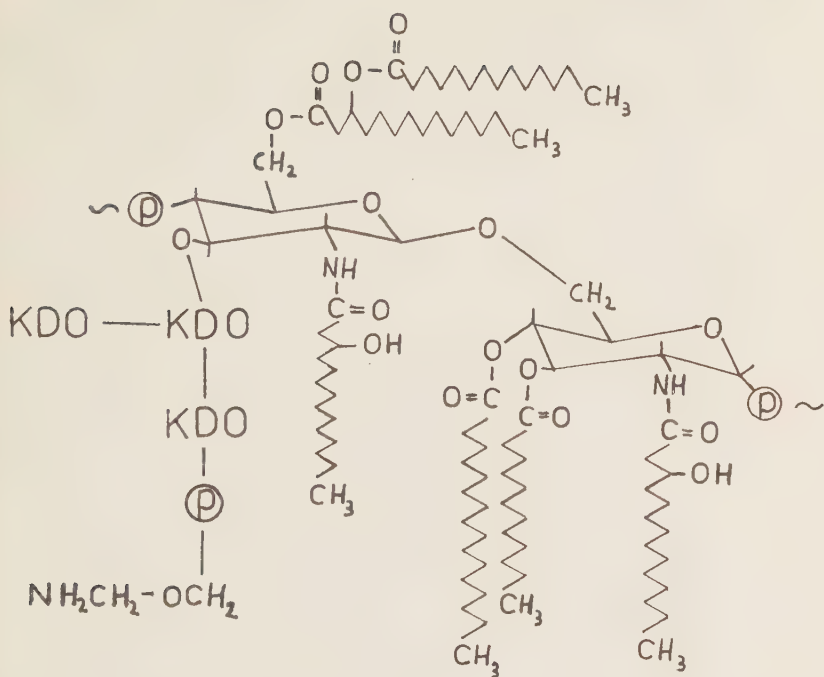


Abb. 2 : Chemische Struktur des von uns verwandten LPS der Defektmutante *S. minnesota* R 595 (64) . Nach der Klassifikation in R-Chemotypen handelt es sich um eine Re - Mutante, deren Region II auf 3 KDO - Zucker und einen Phosphoäthanolaminsubstituenten verkürzt ist. Die Region I fehlt völlig.

Das Lipoid A (Region III) besteht aus einem 1,6 gebundenen Glucosamin - Disaccharid mit 2 Phosphatgruppen. Die 3 Hydroxyl - und die 2 Aminogruppen sind durch langkettige Fettsäuren substituiert (Laurin-, Palmitin-, Myristin- und 3 Hydroxymyristinsäure) .

Die Positionen der estergebundenen Fettsäuren sind noch nicht genau bekannt.

Fettsäuren verestert. Ihre chemische oder enzymatische Abspaltung (23-27) führt zur Detoxifizierung, so daß den Fettsäuren eine sehr entscheidende Bedeutung für die Toxizität des Lipoids zuzukommen scheint(28).

Diese enorme Toxizität zeigt sich nach Endotoxininjektionen neben der spezifischen Antikörperproduktion in sogenannten unspezifischen Reaktionen wie z.B. (28) in einer Leukopenie mit nachfolgender Leukozytose, Auslösung des Sanarelli-Shwartzman-Phänomens, Aktivierung des Komplementsystems und des RES, enzymatischer und hormoneller Aktivierung, Fieber, Schock und Tod.

Über den Wirkungsmechanismus dieser pathophysiologischen Effekte besteht bis heute noch keine Klarheit. Es ist nicht einmal bekannt, ob die zahlreichen unterschiedlichen Reaktionen auf Endotoxinapplikation einen einheitlichen Wirkungsmechanismus haben. Die große Spanne wirksamer Endotoxinkonzentrationen zwischen 1 ng für die Fieberauslösung und mehr als 10^5 ng letaler Toxizitätsdosis macht allerdings unterschiedliche Mechanismen wahrscheinlich (28,29).

Die meisten Untersucher, an ihrer Spitze STETSON (30), rücken immunologische Prozesse in den Mittelpunkt der Diskussion. Alle typischen Endotoxineffekte sind nach dieser Theorie als Antigen/Antikörper-Reaktionen aufzufassen. Die lebenslange Auseinandersetzung höherer Organismen mit gramnegativen Bakterien soll zur Bildung sogenannter natürlicher Antikörper führen. Nach Injektion von Endotoxin kommt es dann als Folge einer Antigen/Antikörper - Reaktion zur anaphylaktischen Reaktion mit Schock und Tod (Sekundäre Toxizität) .

Gleichermaßen laufen, wie KIM und WATSON (21,31) zeigen konnten, endotoxische Reaktionen ab, die unabhängig von der immunologischen Disposition des Organismus sind (Primäre Toxizität). Hierbei soll es zu einer Anheftung des Endotoxins über Rezeptoren

an die Zellen des RES kommen. Über Enzymaktivierung und Freisetzung endogener Mediatoren entstehen biologisch aktive Substanzen, die das Gefäßsystem oder - wie im Falle des endogenen Pyrogens aus polymorphnuklearen Leukozyten - das Nervensystem beeinflussen können (32- 35) .

2. Fragestellung und Zielsetzung

Durch zweimalige Injektion von Endotoxin läßt sich eine aktivierte intravasculäre Gerinnung auslösen, die dann zum Sanarelli-Shwartzman-Phänomen führt. Obwohl diese Endotoxinwirkung bereits sehr eingehend studiert worden ist, konnte der exakte Wirkungsmechanismus bisher nicht aufgeklärt werden. Insbesondere ist nicht bekannt, auf welche Weise die Endotoxininjektion den Gerinnungsmechanismus in Gang setzt. Wie bei der direkten Wirkung von Endotoxin wird auch hier eine Veränderung des Endothels diskutiert, wobei die Gerinnung dadurch eingeleitet werden soll, daß Plättchen und oberflächenaktivierbare Gerinnungsfaktoren dann durch die veränderte Endotheloberfläche zu aktiven Gerinnungskomponenten umgeformt werden. Die direkte Wirkung von Endotoxin auf das Endothel ist jedoch im einzelnen bisher nicht nachgewiesen.

Wir gingen bei unseren Untersuchungen von der Überlegung aus, daß sich eine Endothelschädigung der peripheren nutritiven Kapillaren dadurch bemerkbar macht, daß das vom Kapillarsystem versorgte Parenchym in seiner Funktion und Struktur gestört wird. Als geeignete Peripherie sehen wir die Leber an. Einmal hat sie einen besonders lebhaften Stoffaustausch mit dem Blut, zum anderen erhofften wir uns von der Leber als wichtigem Teil des Retikuloendothelialen Systems weitere Aufschlüsse über die Beteiligung dieses Systems an den Endotoxineffekten. Daher wählten wir zum Studium der isolierten Wirkung von Endotoxin auf das

Kapillarendothel der Leber das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber, über das an unserem Institut bereits mehrjährige Erfahrungen vorliegen (54,55).

Die pyrogene Wirkung des Endotoxins soll darauf beruhen, daß Endotoxin aus den Leukozyten ein sogenanntes ' endogenes Pyrogen ' freisetzt. Auch eine Beteiligung anderer im Blut vorhandener Elemente wird hypothetisch diskutiert. Eine Einwirkung von Endotoxin auf Blut ist auch in vitro nachvollziehbar.

Um auch diesen Wirkungsmechanismus zu erfassen, inkubierten wir für einen Teil unserer Versuche das Endotoxinpräparat mit Humanblut. Das hieraus gewonnene Plasma gaben wir dann dem Perfusat in verschiedener Dosierung zu. Um Fehldeutungen durch unspezifische Plasmaeffekte zu vermeiden, inkubierten wir parallel hierzu Blut ohne Endotoxinzugabe, mit dem wir Kontrollversuche durchführten.

Eine Beteiligung des RES bei der Endotoxinwirkung versuchten wir zu beeinflussen, indem wir in einem weiteren Teil dieser Arbeit das RES durch vorherige Tuscheinjektionen blockierten.

Wenn unsere oben angestellten Überlegungen zutreffen, dann müßte sich eine Kapillarendothelschädigung in einer veränderten Versorgung der darunterliegenden Parenchymzellen zeigen, wobei sowohl die Versorgung mit Sauerstoff als auch mit den übrigen, durch das Blut antransportierten Bausteinen verändert sein sollte. Daher untersuchten wir zunächst einmal in Vorversuchen, wie sich eine veränderte O₂-Versorgung auf die Leistung des darunterliegenden Leberparenchyms auswirkt. Dies erreichten wir in 2 Vorversuchsreihen :

- a. durch unterschiedliche Konzentrationen von Fluorocarbon als Sauerstoffträger und
- b. durch Abbruch der O₂-versorgung nach verschiedenen Zeiten.

3. Material und Methodik

a. Tiermaterial

Verwendet wurden bei unseren Perfusionsversuchen weibliche Wistar-Ratten (Fa.S.Ivanovas, Versuchstierzucht, 7967 Kisslegg i. Allgäu) mit einem Körpergewicht zwischen 220 und 280 g . Dementsprechend lag das Lebergewicht bei durchschnittlich 8 - 10 g. Die Tiere wurden zu mehreren in Käfigen gehalten und mit dem üblichen Standard-Trockenfutter und Wasser ad libitum ernährt. Zur Eingewöhnung wurden sie mindestens 10 Tage vor dem jeweiligen Versuch unter täglich konstanten Bedingungen in unserem Tierstall gehalten.

b. Operationstechnik

Nach Betäubung mit Urethan (Fa. Merck, Darmstadt) in einer Dosierung von 5 ml / kg Körpergewicht einer 20 %igen Urethanlösung i.p. fixierten wir die Tiere in Rückenlage. Zur Hepatektomie folgten wir der von L.MILLER (36) beschriebenen Operationstechnik in der von uns wie folgt geringfügig modifizierten Form :

Nach medianer Laparatomie bis zum Xiphoid und Durchtrennung der ligg. gastrohepaticum und gastroduodenale wurde 1 ml Heparin (Liquemin^R, Fa.Roche, 1 : 5 verdünnt, entsprechend 500 USP-Einheiten) in die V. femoralis injiziert. Anschließend erfolgte die Präparation und Kanülierung von Ductus choledochus (Katheter : B.Braun, Melsungen, 0,8 mm) und V. portae (Braunüle, B.Braun, Melsungen, Gr.I R). Nach Thoraxeröffnung wurde zusätzlich die V.cava superior vom Herzen her mit einer Braunüle, Gr. 2 R kanüliert und die untere Hohlvene nach distal oberhalb der vv. lienales abgebunden.

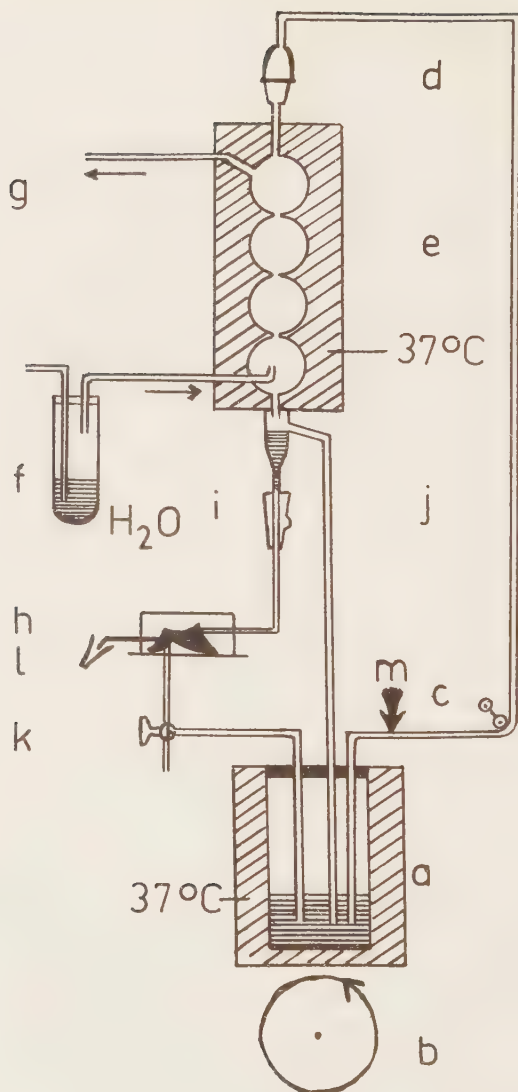


Abb. 3 : Schema der von uns benutzten Per-
fusionsapparatur (Erklärungen
im Text) .

Die solchermaßen präparierte Leber wurde unmittelbar nach Entnahme gewogen und anschließend mit 40 - 50 ml auf 37°C erwärmter physiologischer Kochsalzlösung vorsichtig blutleer gespült.

Die Zeitdauer der Ischämie von der Kanülierung der Pfortader bis zum Anschluß an den Perfusionskreislauf betrug im allgemeinen 3 - 5 Minuten.

Bei einem Teil unserer Versuche wurde das RES der Leber blockiert durch Applikation von 0,5-0,7 ml schwarzer China-Tusche, 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Tusche wurde 45 min vor Operationsbeginn beim narkotisierten Tier in die V. femoralis injiziert.

c. Apparatur

Unsere Versuchsanordnung entsprach weitgehend dem von L.MILLER (37) und H.SCHIMASSEK (38) angegebenen Aufbau :

Aus einem thermostabilisierten Voratsgefäß (37°C) (a) mit magnetischem Rührer (b) wurde das Perfusionsmedium durch eine Rollenspume (c) über eine Blasenfalle (d) (Tropfkammer eines Einmal-Bluttransfusionsgerätes) in den Oxygenator (e) gepumpt. Wir begasten mit Carbogen (f) (Druck ca. 5 cm H₂O); überschüssiges Gas wurde über eine CO₂- Falle (g) (20 % KOH-Lösung) aus dem geschlossenen Perfusionssystem eliminiert. Aus der " Lunge " strömte das Perfusat über den in der Pfortader liegenden Katheter in die Leber, die in einer feuchten Kammer lag (h). Oberhalb der Leber befand sich eine Schlauchklemme (i) zur Regulierung des Leberdurchflusses. Ein konstanter hydrostatischer Druck von ca. 25 cm H₂O auf die Leber wurde dabei durch einen geringen Flüssigkeitsstau unterhalb des Oxygenators dank einer Überlaufvorrichtung (j)

direkt ins Vorratsgefäß erreicht. Aus dem V.cava-Katheter tropfte das Medium dann über einen Dreiwegehahn (k), der zur Entnahme unserer Proben diente, ins Vorratsgefäß zurück. Ebenfalls ins Vorratsgefäß mündete auch der zuführende Schlauch des NaOH- Titriergehätes. Der Meßkopf des pH-Meters befand sich bei m .

Das gesamte Schlauchmaterial für unsere Perfusionsapparatur entnahmen wir dem Sangofix Bluttransfusionsgerät.

Die Galle wurde über den Gallenkatheter in einem seitlich der feuchten Kammer angebrachten Eppendorf-Gefäß gesammelt (l) .

4. Angaben zur Perfusion

Die Sauerstoffversorgung erfolgte durch ein Gasgemisch aus 5 % CO_2 und 95 % O_2 (carbogen) .

Im 2. Teil unserer Vorversuche (Abbruch der Sauerstoffversorgung) begasten wir das Perfusat während der anoxischen Phase stattdessen mit Stickstoff. Der Gasdruck lag immer um 5 cm H_2O . Der Durchfluß des Perfusates durch die Leber betrug ca. 30 ml/ min. Insgesamt wurde 3 Stunden lang perfundiert.

Zur Analyse wurden Proben von je 4 - 5 ml halbstündlich entnommen. Gleichzeitig wurde das Auffanggefäß für die Galle gewechselt. Das Endotoxinpräparat wurde jeweils 1 std nach Perfusionsbeginn ins Vorratsgefäß gegeben. Das anfängliche Flüssigkeitsvolumen des Perfusionsmediums betrug 100 ml . Die Konstanthaltung des pH auf 7,2 erfolgte durch kontinuierliche Titration mit 1-n Natronlauge, deren Verbrauch als Maß für die Säurebildung ebenfalls halbstündlich protokolliert wurde.

e. Perfusionsmedium

Wir verwendeten zur Perfusion jeweils 100 ml KREBS-HENSELEIT - Puffer (RAUEN (39)). Zur Aufrechterhaltung des onkotischen Druckes lösten wir darin 5 g Serum-Albumin vom Rind, reinst (Behringwerke AG, Marburg / Lahn, Charge A 981). Markiert wurde das Albumin durch 150 μ l einer 0,1 %igen Evans-Blue Lösung. Zur Prüfung der Gallenfunktion gaben wir außerdem 50 μ l einer 50 %igen Bromthaleinlösung (entsprechend 2,5 mg Phenoltetrabromthaleindinatriumsulfonat) hinzu.

Im 1. Teil unserer Vorversuche verwandten wir als Sauerstoffträger eine 3 min lang ultrabeschallte Fluorkohlenwasserstoffsuspension (FC-75 , Fa. Minnesota Mining & Manufacturing Company , Düsseldorf) in Konzentrationen bis 9 % . Die Teilchengröße lag bei diesen Versuchen unter 5 μ Teilchendurchmesser.

f. Herstellung des Endotoxinpräparates

Zur Untersuchung der endotoxischen Wirkung auf die isolierte perfundierte Leber verwandten wir das durch die Phenol-Wasser-Methode (3) bzw. die Phenol-Chloroform-Petroläther-Methode (4) gewonnene Lipopolysaccharid der Defektmutante S. minnesota R 595 *.

Das als weißes Pulver vorliegende isolierte Endotoxin lösten wir in physiologischer Kochsalzlösung. Um das schollig aggregierte Endotoxin überhaupt in Lösung bringen zu können, mußten wir das Gemisch von 1 mg Endotoxin pro ml Kochsalzlösung ca. 2 1/2 min lang ultrabeschallen (Apparat : Branson Sonic Power,

* Für die Herstellung und Überlassung des Endotoxinpräparates danken wir Herrn Dr. E.Th.Rietschel, Max-Planck-Institut für Immunobiologie, Freiburg .

Sonifer; Intensität: Stellung 8) .

Von dieser Lösung gaben wir im Rahmen unserer Untersuchungen zwischen 0,010 ml und 1 ml jeweils 1 std nach Perfusionsbeginn zum Perfusionsmedium hinzu.

g. Herstellung des endotoxininkubierten Plasmas

Wir inkubierten je 50 ml frisch entnommenen menschlichen Citratblutes (4800 Leukozyten / mm^3) bei 33°C in wechselnd langen Zeiten zwischen 1 std und 24 std mit je 2 ml der 100 mg%igen Endotoxinlösung. Unmittelbar danach zentrifugierten wir bei 2600 U / min ca. 10 min lang und froren den Plasmaüberstand in 10 ml Portionen bis zur Verwendung bei -20°C ein. Falls das Endotoxin mit Blutbestandteilen - besonders Leukozyten - reagiert hat und dabei endogene Mediatoren wie z.B. endogenes Pyrogen gebildet wurde, müßten sich diese im überstehenden Plasma befinden.

Aus demselben Blut gewannen wir unser Vergleichs-plasma, das anstatt mit Endotoxinlösung mit 2 ml reinem Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert wurde.

Nach Zugabe des Citrat-Plasmas zum Perfusionsmedium war der Durchfluß durch die Leber bisweilen schlecht. Wir vermuten, daß die Ca-Ionen im Puffer zur partiellen Gerinnung geführt haben. Daher gaben wir dem Plasma nach dem Auftauen 5 Einheiten Liquemin^R / ml Plasma zu.

h. Meßmethodik

Als Maß für den Funktionszustand der Leber haben wir folgende Parameter gemessen :

a. Regulation des Glukosespiegels im Perfusat

Die Glukosekonzentration in den Proben des Perfusats berechneten wir mit der GOD-Perid Methode

unter Verwendung des entsprechenden Testsatzes der Fa. Boehringer, Mannheim (40) .

b. Gallenproduktion

Halbstündlich wurde das Auffanggefäß gewechselt und das darin enthaltene Volumen mit Marburg-Pipetten bestimmt.

c. BSP-Clearance

Die BSP-Clearance ergab sich aus der BSP-Konzentrationsabnahme im Perfusat. Zusätzlich maßen wir die BSP- Konzentrationen in den Gallenproben mit der von RICHTERICH angegebenen Methode (41) .

d. Säureproduktion

Die kontinuierliche Titration des Mediums durch einen mit dem pH-Meter gekoppelten Titrierautomaten mit 1-n Natronlauge wurde am Gerät direkt in ml angezeigt.

Als Maß für die während der Perfusion auftretende Zellschädigung wurden bestimmt :

a. Kalium-Austritt

Die Kaliumwerte wurden flammenphotometrisch erfasst. Die Angabe erfolgte in mval / l . Um den Kaliumaustritt pro Leber zu erhalten, rechneten wir diese Werte unter Berücksichtigung des abnehmenden Perfusionsvolumens und des im Krebs-Henseleit-Puffer befindlichen Kaliums auf mval Kaliumaustritt pro Leber und halber Stunde um .

b. Austritt der cytoplasmatischen Enzyme LDH, GOT sowie des partiell mitochondrialen Enzyms GPT

Die Enzymaktivität wurde mit den entsprechenden Enzym-Testsätzen der Fa. Boehringer, Mannheim er-

mittelt (42 - 44). Sie wurde zunächst in mU / ml angegeben. Auch hier erfolgte eine Umrechnung auf mU pro Leber, um den absoluten Enzymaustritt aus der Leber zu erfassen.

c. Austritt des mitochondrialen Enzyms GLDH

Auch hier wurde der GLDH Enzym-Testsatz der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet. (45) .

d. Evans-Blue Extinktionen

Wir gaben 150 μ l einer 1 %igen Evans-Blau Lösung zu den 100 ml Perfusionsmedium. Die Intensität in den Proben bestimmten wir mit dem Photometer Eppendorf bei 578 nm .

i. Verfahren der statistischen Auswertung *

Zur Auswertung der Ergebnisse unserer Hauptversuche benutzten wir das Modell der partiell hierarchischen Varianzanalyse mit 4 und 3 Faktoren. Die im F-Test statistisch zu sichernden Differenzen in den Kurvenverläufen wurden mit dem Scheffé - Test genauer untersucht. (46 - 48) .

1. Modell der partiell hierarchischen Varianzanalyse

Die Varianz erhält man durch Quadrieren der Differenz zwischen dem Einzelwert (E) und dem Mittelwert (M). Sie dient zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Zufallsgröße $|E - M|$ nicht kleiner

* Für die Durchführung der erforderlichen Berechnungen danken wir dem Institut für Dokumentation und Statistik der Justus-Liebig-Universität, Gießen (Dir.: Prof. Dr. J. Dudeck) .

Besonderer Dank für die Beratung und Betreuung bei der Durchführung des statistischen Teiles gilt den Herren Glettler und Höbel.

ist als eine beliebig gewählte positive Zahl .
Bei Summen paarweise unabhängiger Zufallsgrößen
addieren sich die Varianzen (49) .

Mit dem Modell der partiell hierarchischen Varianzanalyse (VA) lassen sich in Verbindung mit dem F-Test statistisch signifikante Differenzen zwischen den einzelnen Mittelwerten bei unseren Versuchen nachweisen. Zur genaueren Feststellung der Signifikanz verursachenden Gruppe(n) und dem Zeitpunkt des Signifikanzeintrittes sind allerdings weitere statistische Verfahren erforderlich (S. auch Scheffé - Test) .

Die Berechnungen wurden beim Kalium in der Einheit mval / l und bei den Enzymen in mU / ml durchgeführt. Um der Volumenverminderung von 100 ml auf 70 ml infolge der halbstündlich entnommenen Proben Rechnung zu tragen und um den absoluten Kalium - bzw. Enzymaustritt zu erfassen, wurden diese Angaben am Ende noch auf mval Kalium - bzw. mU Enzymaustritt pro Leber umgerechnet.

Wir benutzten in der VA die folgenden Faktoren:
A (Zeit) , B (Tiere) , C (Endotoxingruppen) ,
D (Tusche ; nur bei der 4faktoriellen VA) .

Varianzanalyse mit 4 Faktoren

In einem ersten varianzanalytischen Ansatz untersuchten wir die Wirkung von Tusche und Endotoxinen sowie ihre Beziehungen untereinander und den Einfluß des zeitlichen Verlaufes. Aus den unten genannten Gründen (Hauptversuche, S. 69 - 70) konnten wir dabei nur 24 Versuche verwenden.

Varianzanalyse mit 3 Faktoren

Der Verzicht auf eine statistische Erfassung der Tuscheeffekte ermöglichte die Verwendung aller durch-

geführten Versuche. In einem 1. Test wurden die Gruppen ohne Tusche auf Endotoxineinflüsse untersucht und getrennt hiervon in einem 2. Test die Gruppen mit Tusche.

Um Verfälschungen der Ergebnisse durch ein zu starkes Operationstrauma möglichst klein zu halten, wurden bei der 3 faktoriellen VA sämtliche Versuche ausgesondert, bei denen der Enzymanstieg (LDH, GPT, GOT) bei mindestens 2 der 3 Enzyme innerhalb der ersten Stunde nach Perfusionsbeginn größer war als es der doppelten Standardabweichung - errechnet aus allen Versuchen - während dieser Zeit entspricht. Da das schädigende Agens ja immer erst nach 1 std Perfusionsdauer zugegeben worden war, mußten folglich bis zu diesem Zeitpunkt alle Lebern etwa gleiche Enzymaustritte zu verzeichnen haben. Unverhältnismäßig hohe Enzymkonzentrationen in der 1. std. lassen daher die Leber als von Anfang an geschädigt erscheinen.

Die Berechnung der Standardabweichung σ erfolgte nach der Formel :

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

wobei x_1 = Einzelwert, $\bar{x}$ = Mittelwert, n = Zahl der Versuche

Die rechnerische Durchführung findet sich im Anhang zur statistischen Auswertung (S. 100) .

b. Der F - Test

Die Nullhypothese, daß die erhaltenen Mittelwerte sich nur zufällig unterscheiden, prüft man mit dem F-Test. Wird der durch die VA erhaltene F-Wert größer als der mit Hilfe der entsprechenden Freiheitsgrade tabellarisch ermittelte kritische F-Wert (65) , so ist die Nullhypothese abgelehnt. Bleibt er dagegen unterhalb der zulässigen Werte der F- Verteilung, so wird die Nullhypothese beibehalten.

Die Zurückweisung der Nullhypothese wird in der Regel mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5 % oder von unter 1 % vorgenommen.

Der F - Test weist nach, wenn ein Faktor (A,B,C oder D) in der VA oder eine Wechselbeziehung zwischen 2 oder mehr Faktoren signifikant wird, sagt aber nichts darüber aus, wann im zeitlichen Verlauf oder wodurch diese Signifikanz entsteht.

Die Frage, ab wann eine Gruppe sich statistisch signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet und welche Gruppe das im einzelnen ist, kann durch weitere statistische Verfahren abgeklärt werden, von denen hier nur der Scheffé - Test erwähnt sei.

c. Der Scheffé - Test

Im F - Test konnte bei der 4 faktoriellen VA (24 Versuche) bei uns keine Endotoxinwirkung nachgewiesen werden. Unter den Bedingungen der VA mit 3 Faktoren tauchten im Gegensatz hierzu - bedingt durch das weit größere verwertbare Material (41 Versuche) - statistisch zu sichernde Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen auf. Daher wurde im Anschluß an die VA zur weiteren Untersuchung der Scheffé - Test durchgeführt (S.S. 100 - 109) .

In diesem Test werden die Kurvenverläufe der einzelnen Versuchsgruppen unter Berücksichtigung der in der VA geschätzten biologischen Variabilität (MAQ_{Rest}) miteinander verglichen. Liefert der Scheffé - Test nicht signifikante Vergleichszahlen für die Kurvenverläufe bzw. nicht signifikante Mittelwertsdifferenzen, so können die Kurven noch als parallel zueinander bezeichnet werden.

Bei signifikanten Mittelwertsdifferenzen dagegen kann die Abweichung der einzelnen Kurven

voneinander nicht mehr als zufällig gelten.

Aufgrund der gegen Ende der Perfusion stärker divergierenden Kurvenverläufe bei unseren Versuchen beschränkten wir uns auf einen Vergleich der $2\frac{1}{2}$ - und 3 -h-Werte. Falls diese sich noch im Bereich zufälliger Abweichung befinden, kann man das in unserem Fall - unter Berücksichtigung der Streuung - erst recht für die früheren und weniger weit voneinander entfernten Zeitpunkte annehmen.

B. 1. Versuchsreihe (Vorversuche)

Untersuchungen über die Bedeutung des Fluorocarbons FC-75 als Sauerstoffträger am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber.

1. Einleitung . Zielsetzung

Fluorocarbone sind Verbindungen, bei denen der sonst kohlenstoffgebundene Wasserstoff durch Fluor ersetzt wurde. Man erhält dadurch eine chemisch außerordentlich inerte Flüssigkeit gegen Säuren, Alkalien, oxidierende und reduzierende Agenzien mit hoher Temperaturbeständigkeit und einer sehr großen Benetzungsfähigkeit (Die Oberflächenspannung ist gegenüber Wasser um mehr als 80 % erniedrigt !) (50).

Wie H.A.SLOVITER, T.KAMIMOTO (51) und R.P. GEYER (52,53) bereits vor einigen Jahren zeigen konnten, sind Fluorocarbone in der Lage, als CO_2 - und O_2 - Träger zu fungieren. Die Fluorchemikalie kann 20 mal soviel Sauerstoff aufnehmen wie Wasser und ist damit - wenigstens für eine bestimmte Zeitdauer - im O_2 - Transport ebenso leistungsfähig wie eine entsprechende Erythrocytensuspension.

Wir haben durch 3 minütige Ultrabeschallung einer FC-75 Lösung eine feindispergierte weißliche Emulsion erhalten, von der wir uns eine verbesserte Sauerstoffversorgung bei unseren Perfusionsexperimenten und damit eine geringere Schädigung der durchströmten Leber erhofften (54, 55) .

Wie auch beim 2. Teil unserer Vorversuche (Abbruch der Sauerstoffversorgung) erwarteten wir überdies durch unterschiedliche Konzentrationen an Sauerstofftransportierendem Material (FC-75) eine unterschiedlich gute O_2 - Versorgung der Leber mit entsprechenden Schädigungen bei den weniger gut mit

Sauerstoff versorgten Organen.

Auf diese Weise hofften wir ein Modell zu erhalten, mit dem wir die in den Hauptversuchen zu erwartenden Parenchymschädigungen unter Endotoxineinfluß hätten vergleichen können.

2. Versuchsplanung

In einer ersten orientierenden Versuchsreihe A (5 Versuche) perfundierten wir je eine Leber mit Zusätzen von a. 0% , b. 1,5 % , c. 3 % , d. 6 % und e. 9 % FC-75 zum Perfusionsmedium.

Die Auswertung zeigte eine deutliche Verschlechterung des Zustandes der Leber bei Fluorkohlenwasserstoffkonzentrationen oberhalb 3 % . Daher beschränkten wir uns in einer 2. Versuchsreihe B (11 Versuche) auf den Bereich zwischen 0 % und 3 % FC-75 . Hier wurden von jeder Konzentration mindestens 2 übereinstimmende Versuche durchgeführt. Bei der Gruppe mit 2 % FC-75 im Perfusat kam es nach ca. 2 stündigem Perfusionsverlauf in 2 Fällen zu einer ungeklärten Schädigung der Leber, die sich insbesondere in einem Enzymanstieg um ein Vielfaches der Norm manifestierte. Diese beiden Versuche wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Ein weiterer Versuch dieser Gruppe mußte nach 2 1/2 std wegen Schaumbildung im System abgebrochen werden. Der 3-h-Wert fehlt daher hier.

Sämtliche angegebenen Werte der Reihe B sind Mittelwerte aus allen Einzelversuchen einer Gruppe.

Der Unterschied bei den Ausgangswerten zwischen den beiden Versuchsreihen A und B erklärt sich dadurch, daß in der ersten Versuchsreihe (0 % bis 9 %) die erste Probe unmittelbar nach Anschluß der Leber an den Perfusionskreislauf entnommen wurde (0-min-Wert) . Die Analysenwerte (Glukose, BSP

und Kalium) geben hier die Zusammensetzung des Perfusionsmediums wieder und die Enzymwerte sind Leerwerte. Bei den weiteren Versuchen - auch in den folgenden Experimenten mit Endotoxinzugabe - wurde die erste Probe erst 5 min nach Perfusionsbeginn entnommen (5-min-Wert). Bis dahin war die Leber durchspült und die durch das Operationstrauma freigesetzten Enzyme waren ins Perfusionsmedium gelangt.

Auf diese Weise befinden sich bereits Enzyme entsprechend dem jeweils unterschiedlich großen Operationstrauma vor Beginn der eigentlichen Perfusionsveränderungen im Perfusat. Das Ausmaß der Leberschädigung vor dem eigentlichen Versuchsbeginn kann so aus den 5-min- Ausgangsaktivitäten gut beurteilt werden. Wegen dieser unterschiedlichen Anfangswerte werden im folgenden Teil die Versuche erst ab dem 30-min-Wert besprochen.

Auch der 3-h-Wert wird z.T. zur Auswertung nicht mehr herangezogen, weil hier wiederholt unspezifische Schädigungen nach dem 2 1/2-h-Wert aufgetreten sind.

3. Ergebnisse

a. Glukose

Die Einstellung eines annähernd konstanten Glukosespiegels ist bei den Versuchen der Reihe A bei 0 % igen und 1,5 % igen FC-75 Zusätzen im wesentlichen nach 1 std erreicht (Anstieg von 30 - 50 mg% am Anfang auf ca. 150 mg%), bei 3 % dagegen erst nach etwa 2 std auf wesentlich höherem Niveau (286 mg % nach der 2. std) (Abb.4 a).

In der Reihe B war nach ca. 1 std ein Spiegel von 100 - 150 mg% erreicht (Ausgangswerte im Perfusionsmedium um ca. 40 mg%), der bei allen FC-75 Konzentrationen bis einschließlich 3 % während der gesamten Perfusionsdauer aufrecht erhalten werden konnte (Abb. 4 b).

Bei den Versuchen mit noch höherer FC-75 Konzentration im Perfusionsmedium steigt die Glukose im Perfusat kontinuierlich von Ausgangswerten um 50 mg% auf 450 - 550 mg% nach 3 std an.

b. Gallenmenge

Auch hier liegen die Kurven bei den 0 - 3 %igen FC-75 Zusätzen - ohne sich voneinander deutlich zu unterscheiden - eindeutig günstiger als die der höheren Fluorkohlenwasserstoffkonzentrationen (Bei 0 % bis 3 % FC-75 mittlere Gallenmenge der ersten beiden Stunden jeweils um ca. 0,080 ml / 30 min ; bei 6 % FC-75 bereits Abnahme von ca. 0,030 ml in der ersten halben Stunde auf vollständiges Versiegen des Galleflusses nach 2 Stunden. Bei 9 % wurde keine Galle mehr erhalten (Abb. 5 a) .

Die Reihe B lag bei 0 - 1,5 % iger FC-75 Anreicherung mit Anfangswerten um 120 μ l / 30 min überdurchschnittlich hoch, nahm dann jedoch bis zur 3. std auf 20 μ l / 30 min ab. Annähernd denselben Verlauf weist auch der erste Versuch mit 3 % FC-75 Zugabe auf, während der Parallelversuch hier durch eine weit überdurchschnittliche Anfangsekretion (0,535 ml in den ersten 90 min) imponiert, die dann jedoch nach 90 minütiger Perfusion sehr rasch gradlinig abnimmt auf einen Endwert von 20 μ l Sekretionsleistung in der letzten 1/2 std. Bei 2% FC-75 Zugabe lag die Gallesekretion in der ersten Stunde schon relativ niedrig (um 65 μ l / 30 min) und versiegte bereits vor Ende der dreistündigen Perfusionsdauer(Abb. 5 b) .

c. BSP- Clearance

Die BSP-Clearance zeigt einen von der jeweils sezernierten Gallenmenge abhängigen und mit ihr gut korrelierenden zeitlichen Verlauf. Die Halbwerts-

zeiten liegen zwischen 39 und 58 min und zeigen keine Beziehung zur Fluorkohlenwasserstoffkonzentration.

d. Säureproduktion

In der Reihe A notierten wir lediglich am Anfang, nach 90 min und am Ende der Perfusion die pH-Werte im Medium.

Im einzelnen zeigten sich bei pH- Ausgangswerten von 7,25 (7,26) nach FC-75 Zusätzen von 0 % und 1,5 % pH-Endwerte von 7,20 bzw. 7,21 .

Bei 3 % war der pH bereits nach 90 min auf 7,11 gesunken und erniedrigte sich bis zum Ende der Perfusion auf 7,07 . Höhere FC-75 Konzentrationen lassen bei pH-Werten um 6,90 (Perfusionsende) auf noch stärkere Säurebildung schließen.

Bei den Experimenten der Reihe B wurde der pH-Wert durch eine Titrierautomatik mit 1-n Natronlauge konstant auf 7,20 gehalten. Der Natronlaugenverbrauch wurde jedoch nicht ausgewertet.

e. Kalium

Der Kaliumspiegel sinkt in allen Fällen in der ersten 1/2 std geringfügig (um 0,02 - 0,04 mval / Leber) unter das Ausgangsniveau ab. In den nun folgenden 60 bis 90 min nimmt die Leber unterschiedlich viel Kalium aus dem Perfusionsmedium auf (0 - 0,2 mval/ Leber) . Während der letzten Stunde steigt dann der Kaliumspiegel in den meisten Fällen um 0,1 - 0,3 mval an. In Anbetracht der außerordentlich großen Streuung (3-h-Werte zwischen - 0,24 mval (Reihe A, 0 %, 1,5 %) und $>1,0$ mval (Reihe B, 3 %)) ist kein Zusammenhang zwischen Kaliumaustritt und der Fluorkohlenwasserstoffkonzentration erkennbar (Abb. 6a u. b) .

f. LDH

Der LDH-Austritt 30 min bis 150 min nach Perfusionsbeginn scheint sich mit steigender FC-75 Konzentration zu erhöhen (S. Tab. 1) . Der unterschiedlich starke Enzymanstieg während der ersten 30 min dürfte Ausdruck der präparationsbedingten Leberschädigung sein (Operation, Ischämie, NaCl-Spülung etc.) (Abb. 7 a u. b) .

Konz.	Reihe	30-min-Wert	150-min-Wert	LDH-Austritt 30- 150 min n.Perf.beg.
0 %	A	27930	30825	2895
0 %	B	9722	17725	8003
1 %	B	11495	20213	8718
1,5 %	A	31635	39975	8340
2 %	B	10735	21300	10565
3 %	B	8788	20925	12137
3 %	A	12225	25875	13650
6 %	A	28860	51225	22365
9 %	A	57000	100500	43500

Tab. 1 : LDH-Austritt während der Perfusion. Alle Angaben in mU / Leber .

g. GPT

Es besteht keine Beziehung zwischen FC-75 Konzentrationen und GPT-Austritt (S. Tab. 2) .

Die Höhe des nach 30 min eingestellten GPT-Spiegels ist unabhängig von der dem Perfusat zugesetzten FC-75 Konzentration und richtet sich wahrscheinlich nach dem Operationstrauma der Leber vor Perfusionsbeginn. Wie Abb. 8 zeigt, bewegt sich die GPT-Aktivität etwa um das bei den jeweiligen Versuchen nach 30 min erreichte Niveau.

h. GOT

Wie auch bei der GPT fand sich hier kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen FC-75 Konzentra-

Konz.	Reihe	30-min-Wert	150-min-Wert	LDH-Austritt 30 - 150 min n.Perf.beg.
0 %	A	2736	2340	- 396
0 %	B	538	1000	462
1 %	B	1330	1350	20
1,5%	A	1549	2625	1076
2 %	B	1568	1738	170
3 %	B	760	2400	1640
3 %	A	1188	863	- 325
6 %	A	713	1913	1200
9 %	A	2109	1665	- 444

Tab. 2 : GPT-Austritt während der Perfusion. Alle Angaben in mU / Leber. (S. auch Abb. 8a u. b).

Konz.	Reihe	30-min-Wert	150-min-Wert	LDH-Austritt 30 - 150 min n.Perf.beg.
0 %	A	2214	4635	2421
0 %	B	2122	4649	2527
1 %	B	2612	6486	3874
1,5%	A	2527	4635	2108
2 %	B	2138	9300	7162
3 %	B	1900	5062	3162
3 %	A	2109	4470	2361
6 %	A	2318	5160	2842
9 %	A	4750	4650	- 100

Tab. 3 : GOT-Austritt während der Perfusion. Alle Angaben in mU / Leber. (S. auch Abb. 9 a u. b) .

tionen. Unabhängig von der zugesetzten FC-75 Menge steigen die Werte anscheinend linear bis auf ca. 6000 mU Gesamt-GOT-Austritt in der 3. std. an .

i. G1DH

Alle G1DH Konzentrationen lagen nach 2 Stunden noch unter 0,5 mU / ml Perfusionsmedium und stiegen im Verlauf der 3. Stunde bis auf maximal 1,0 mU / ml an. Eine Zuordnung zu den einzelnen Fluorkohlenwasserstoffkonzentrationen ist besonders in Anbetracht der möglichen Meßgenauigkeit mit hinreichender Zuverlässigkeit nicht möglich.

j. Evans- Blue

Sämtliche Versuche der Reihe A wurden ohne Zugabe von Evans-Blau durchgeführt.

Bei der Versuchsreihe B wurden dem Perfusat 150 μ l einer 1 %igen Evans-Blau Lösung zugegeben. Es war beabsichtigt, durch eine Abnahme der Evans-Blau Konzentration infolge von Austritt Evans-Blue markierten Albumins aus dem Perfusat in die Leber eine Permeabilitätszunahme der Leberkapillaren nachzuweisen. Es stellte sich jedoch heraus, daß der Evans-Blue Austritt mit der hier benutzten Technik nicht auszuwerten war .

4. Zusammenfassende Beurteilung

Eine Analyse der Ergebnisse zeigt, daß sowohl die Konstanthaltung der Glukosekonzentration als auch die erhaltenen Gallenmengen sowie die BSP-Clearance und die pH-Verschiebung ins Saure bereits ab 3 %igem FC-75 Zusatz deutliche Hinweise auf eine Funktionsverschlechterung des perfundierten Organes geben. Ebenso sind die LDH-Aktivitäten bei Verwendung steigender FC-75 Konzentrationen erhöht. Auch die anfängliche Kaliumaufnahme

durch die Leber ist herabgesetzt oder fehlt bei FC-75 Konzentrationen oberhalb 2 % .

Weniger empfindlich reagierten die Transaminasen. Sie scheinen brauchbare Hinweise erst auf stärkere Schädigungen zu geben. Die relativ geringfügigen Veränderungen der Leber führen offenbar nicht zur Schädigung der Mitochondrien, da sowohl die partiell mitochondriale GOT als auch die vollkommen mitochondriale GldH nicht vermehrt im Perfusionsmedium erscheinen.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse beider Versuchsserien kann gesagt werden, daß ein FC-75 Zusatz von mehr als 3 % zum Perfusionsmedium bei der von uns verwandten Versuchsanordnung sicher nachteilig auf Struktur- und Funktionserhaltung der perfundierten Rattenleber wirkt. Die Versuche im Konzentrationsbereich zwischen 0 % und 3 % lassen dagegen keine hinreichend eindeutigen Unterschiede erkennen. Zwar liegen die Enzymaustritte der Gruppe ohne FC-75 in der Versuchsreihe B unter den Werten der FC-75 enthaltenden anderen Versuche, jedoch kann dieser Befund im Rahmen der relativ großen Streuung ohne weiteres zufällig sein.

5. Schlußfolgerung

Die Versuche haben gezeigt, daß ein Zusatz von FC-75 keine Verbesserung gegenüber der Perfusion nur mit physikalisch gelöstem Sauerstoff bringt.

Das könnte dadurch bedingt sein, daß der physikalisch gelöste Sauerstoff bereits ausreicht, um die Leber optimal mit Sauerstoff zu versorgen, so daß ein zusätzlicher O₂-Transport durch FC-75 nicht wirksam werden kann.

Es könnte aber auch sein, daß die Zugabe von FC-75 die Versorgung der Leber mit Sauerstoff zwar verbessert, die Leber aber an anderer Stelle gleichzeitig soweit schädigt, daß insgesamt die Perfusionsbedingungen verschlechtert sind.

6. Anhang zur 1. Versuchsreihe

Erläuterungen zu den Abbildungen 4a - 9b :

- Abb. 4a : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat während der Perfusion in mg% (Reihe A, 0 % - 9 % FC-75 im Perfusionsmedium) .
- Abb. 4b : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat während der Perfusion in mg% (Reihe B, 0 % - 3 % FC-75 im Perfusionsmedium) .
- Abb. 5a : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen in ml, addierend aufgetragen. (Reihe A, 0 % - 9 % FC-75) .
- Abb. 5b : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen in ml, addierend aufgetragen. (Reihe B, 0 % - 3 % FC-75) .
- Abb. 6a : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums im Perfusat in mval pro Leber (Reihe A, 0 % - 9 % FC-75) .
- Abb. 6b : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums im Perfusat in mval pro Leber (Reihe B, 0 % - 3 % FC-75) .
- Abb. 7a : LDH - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe A, 0 % - 9 % FC-75 .
- Abb. 7b : LDH - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe B, 0 % - 3 % FC-75 .
- Abb. 8a : GPT - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe A, 0 % - 9 % FC-75 .
- Abb. 8b : GPT - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe B, 0 % - 3 % FC-75 .
- Abb. 9a : GOT - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe A, 0 % - 9 % FC-75 .
- Abb. 9b : GOT - Enzymaustritt in mU / Leber. Reihe B, 0 % - 3 % FC-75 .

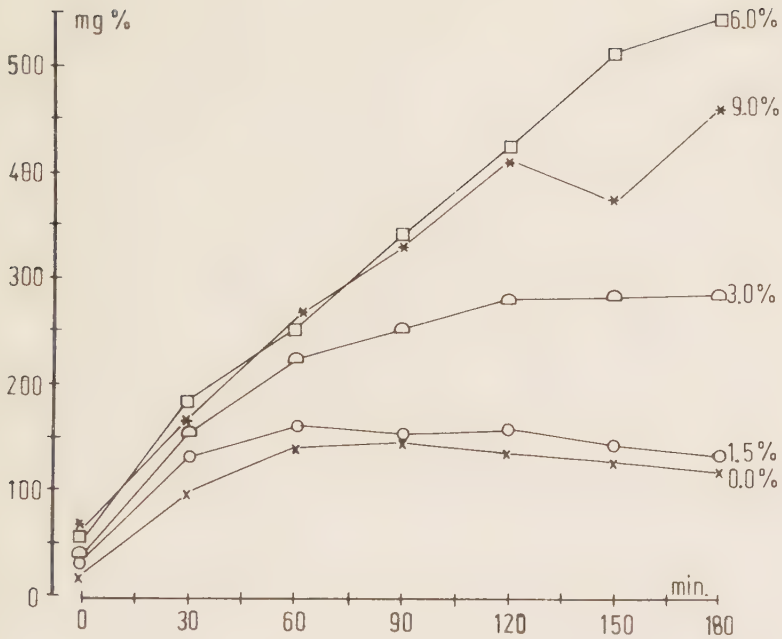


Abb. 4a : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat in mg% bei Verwendung von FC-75 in Konzentrationen von 0% bis 9% (Reihe A) .

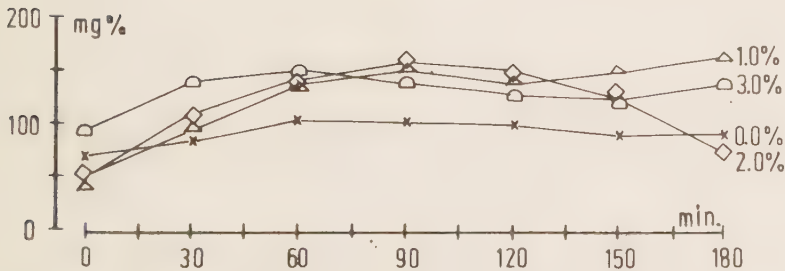


Abb. 4b : Änderung der Glukosekonzentration im Perfusat in mg% bei Verwendung von FC-75 in Konzentrationen von 0% bis 3% (Reihe B) .

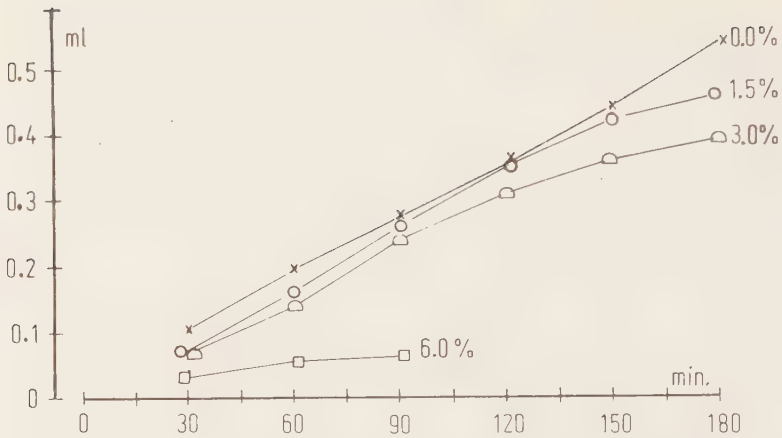


Abb. 5a : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen in ml, addierend aufgetragen.
(Reihe A, 0% bis 9% FC-75 im Perfusat) .

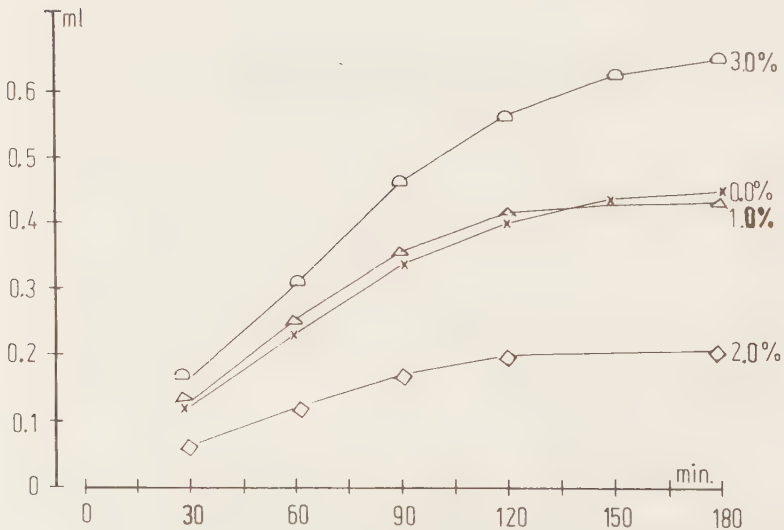


Abb. 5b : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen in ml, addierend aufgetragen.
(Reihe B, 0% bis 3% FC-75 im Perfusat) .

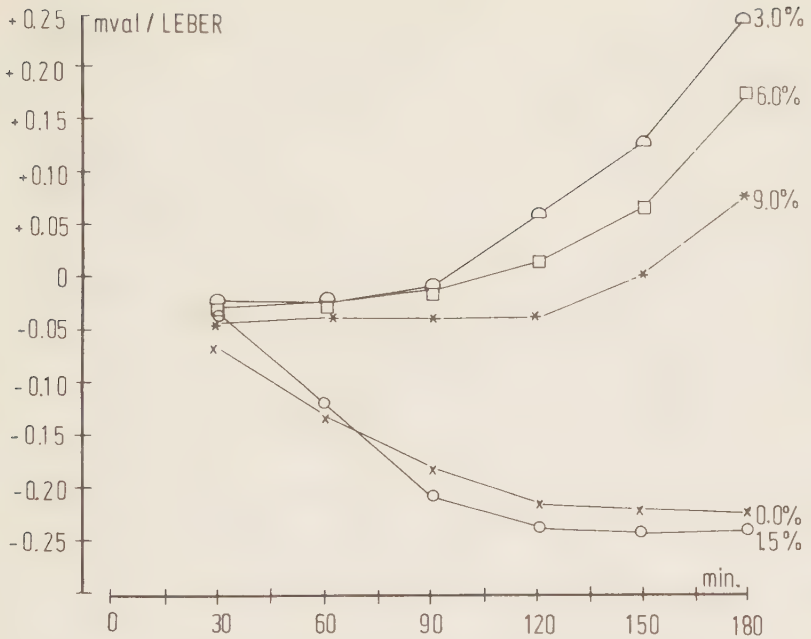


Abb. 6a : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums während der Perfusion. (Reihe A, 0% bis 9% FC-75 im Perfusat) .

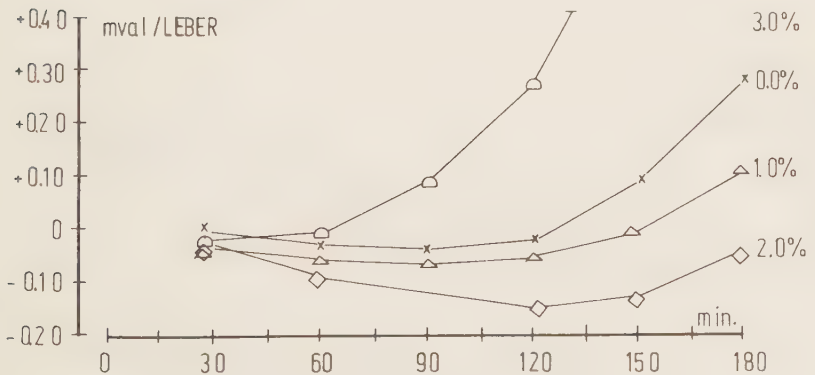


Abb. 6b : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums während der Perfusion. (Reihe B, 0% bis 3% FC-75 im Perfusat) .

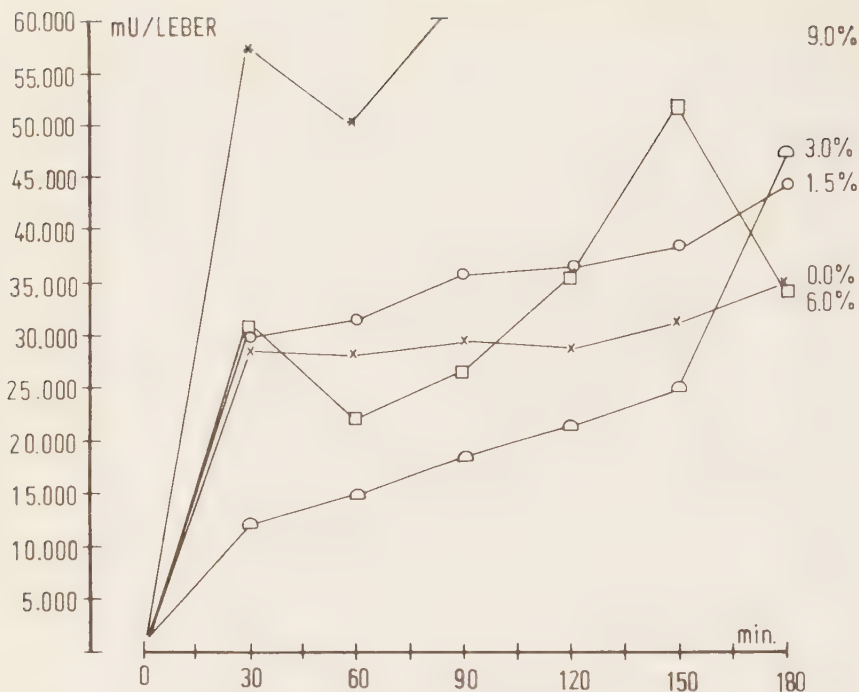


Abb. 7a : LDH - Enzymaustritt in mU / Leber .
(Reihe A, 0% bis 9% FC-75 im Perfusat) .

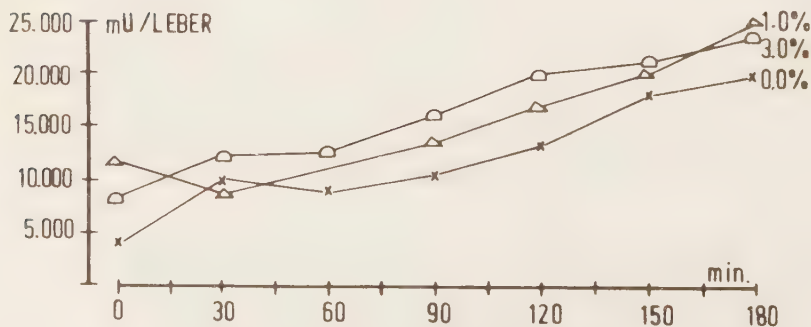


Abb. 7b : LDH - Enzymaustritt in mU / Leber .
(Reihe B, 0% bis 3% FC-75 im Perfusat) .

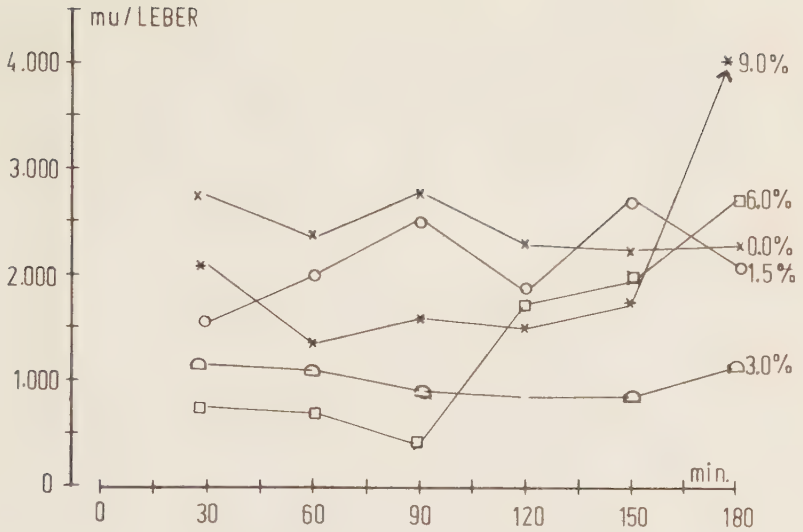


Abb. 8a : GPT - Enzymaustritt in $\mu\text{U} / \text{Leber}$.
(Reihe A, 0% bis 9% FC-75 im Perfusat) .



Abb. 8b : GPT - Enzymaustritt in $\mu\text{U} / \text{Leber}$.
(Reihe B, 0% bis 3% FC-75 im Perfusat) .

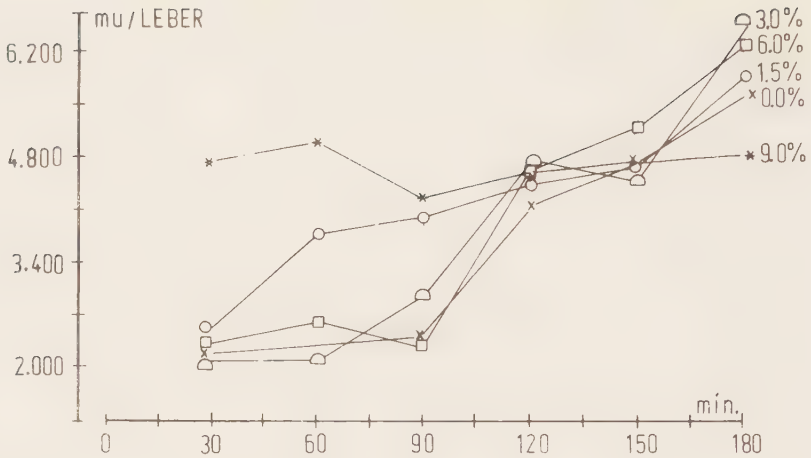


Abb. 9a : GOT - Enzymaustritt in mU / Leber .
(Reihe A, 0% bis 9 % FC-75 im Perfusat) .

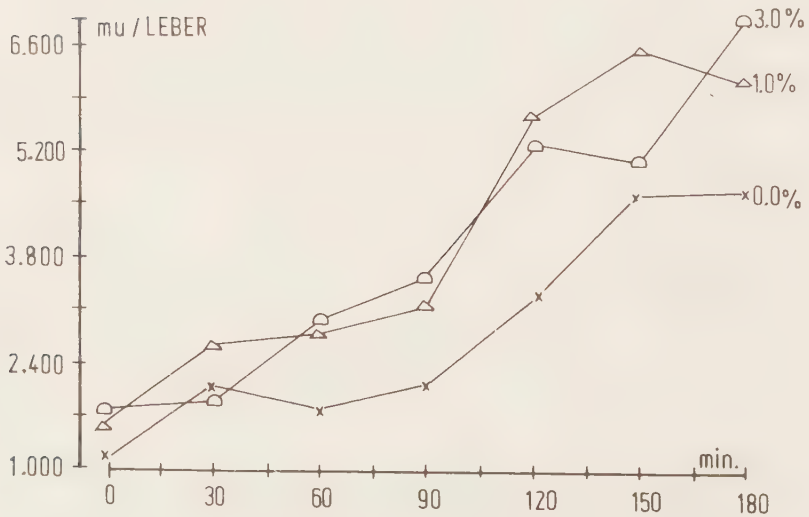


Abb. 9b : GOT - Enzymaustritt in mU / Leber .
(Reihe B, 0% bis 3% FC-75 im Perfusat).

C. 2. Versuchsreihe (Vorversuche)

Untersuchungen über Struktur- und Funktionsänderungen der Leber nach Abbruch der Sauerstoffversorgung am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber.

1. Einleitung. Zielsetzung

Durch Abbruch der Sauerstoffversorgung kommt es in der lebenden Zelle zum Erlöschen des Energiestoffwechsels und damit zum Zelltod. Auch bei der Leber treten in Abhängigkeit von der Zeitdauer der ischämischen Phasen mehr oder weniger ausgeprägte funktionelle und morphologische Veränderungen auf (56 - 60) .

Aufgrund dieser Überlegungen versuchten wir durch Unterbrechung der O_2 - Versorgung bei der isolierten perfundierten Rattenleber ein gut reproduzierbares Modell für eine Leberschädigung kennenzulernen. Mit diesem Modell sollten die in den Hauptversuchen zu erwartenden Parenchymschädigungen unter Endotoxineinfluß verglichen werden.

Die durchgeführten Sauerstoffmangelexperimente zeigen, daß die in der Literatur für die Leber angegebene Toleranzgrenze von 20 - 30 min (57,59) bei totaler Ischämie bei einer 3-stündigen Perfusion des isolierten Organes nicht deutlich erkennbar ist. Wahrscheinlich kommt der - sicherlich eingetretene - zellschädigende Effekt erst zu einem späteren Zeitpunkt zum Tragen (56) .

Auch liegen der angegebenen Ischämie-Toleranzgrenze Experimente mit Abklemmung der Hilusgefäße (A. hepatica propria, V. portae) zugrunde, bei denen neben der Anoxie auch andere schädigende Faktoren wie z. B. Unterbrechung der Nährstoffzufuhr,

der Spülfunktion etc. verschärfend beteiligt sind(61).

Unter anderen experimentellen Bedingungen (62,63) kommt es zu ischämischen Reaktionen, die bis 90 min Hypoxie reversibel zu sein scheinen (62) .

2. Ergebnisse

a. Glukose

Im Gegensatz zur normal mit Sauerstoff versorgten Leber konnte bei keinem der Experimente dieser Versuchsreihe der Glukosespiegel nach Abbruch der O_2 -Versorgung über längere Zeit konstant gehalten werden. Dies war umso deutlicher, je früher die O_2 -Zufuhr unterbrochen wurde.

Nach Abbruch der Sauerstoffversorgung 30 min nach Perfusionsbeginn stieg die Glukosekonzentration im Perfusat linear von Ausgangswerten um 70 mg% auf Endwerte um 400-450 mg% an (S. Abb.10).

Mit Einstellung der O_2 -Zufuhr 1 std nach Perfusionsbeginn konnte die Glukosekonzentration 30 - 60 min nach dem O_2 -Stopp auf Werten von 200 - 300 mg% weitgehend konstant gehalten werden, um dann in der letzten 1/2 std wieder um 60 mg% abzusinken.

Bei Abbruch der O_2 -Versorgung nach 1 1/2 std hat sich erwartungsgemäß bereits 60 min nach Beginn des Experimentes der Glukosespiegel auf Werte zwischen 150 und 200 mg% eingestellt. Nach Ersatz des Sauerstoffes durch Stickstoff kann die Glukosekonzentration noch eine knappe halbe Stunde konstant gehalten werden. Während der letzten 60 min kommt es dann zu einem deutlichen Anstieg um 100 bzw. 150 mg%.

b. Gallenmenge

Die normal oxygenierte perfundierte Leber kann trotz

stetiger Volumenabnahme der sezernierten Gallenmenge während der gesamten 3 stündigen Perfusionsdauer Galle produzieren. (S. Abb. 11) .

Bei Abbruch der Versorgung mit Sauerstoff 30 und 60 min nach Perfusionsbeginn nimmt die Gallesekretion etwas rascher ab als bei ungestörter O_2 -Zufuhr und versiegt bereits nach 2 1/2 stündiger Perfusion (O_2 -Abbruch nach 30 min) bzw. nach 2 stündiger Perfusion (O_2 -Abbruch nach 60 min) .

Die beiden 1 1/2 std lang normal oxygenierten Lebern zeigen demgegenüber auch nach Abbruch der Sauerstoffversorgung keinen Unterschied zu normal versorgten Lebern .

c. BSP- Clearance

Bei intakter O_2 - Versorgung liegt die Halbwertszeit (HWZ) der BSP- Clearance bei etwa 40 min. Nach Abstellen der Sauerstoffversorgung bis 1 std nach Perfusionsbeginn ist die BSP-Clearance gestört :

Bei den Versuchen mit Abbruch der Sauerstoffversorgung nach 30 min fanden wir HWZ von 92, 56 und 36 min (Mittelwert 61 min) . Beginn die anoxische Perfusion nach 1 std, betrug die HWZ 64 min. Stoppt man die O_2 -Versorgung erst 1 1/2 std nach Perfusionsbeginn, so zeigt sich bei HWZ von 34 und 36 min kein Unterschied zu normal mit Sauerstoff versorgten Lebern.

Daraus folgt, daß eine anoxische Perfusion die BSP-Clearance umso stärker beeinträchtigt, je früher sie einsetzt.

d. Kalium

Im bis zum Ende mit Sauerstoff versorgten Per-

fusionsversuch steigt der Kaliumspiegel erst ab 90 bis 120 min - oft nach geringer anfänglicher Senkung - deutlich an. Bei Abbruch der O₂-Versorgung dagegen kommt es unabhängig vom zeitlichen Beginn unmittelbar anschließend zu einem kontinuierlichen Anstieg des Leberkaliums im Perfusat.

Der Gesamtaustritt des Kaliums scheint in seiner Höhe keine Beziehung zu den unterschiedlichen Eintrittszeiten der anoxischen Perfusion aufzuweisen (S. Abb. 12 a u. b) .

e. Enzyme (LDH, GPT, GOT, GLDH)

Wie bereits die Vorversuche der 1. Versuchsreihe mit unterschiedlichen Fluorkohlenwasserstoffkonzentrationen zeigten, ist die GLDH-Bestimmung bei den vorliegenden geringen Schädigungen ein zu grober Parameter. Sie soll deshalb nicht weiter herangezogen werden.

Die übrigen Enzyme verhalten sich weitgehend einheitlich. Zwischen den Versuchen mit Abbruch der Sauerstoffversorgung nach 30 min und nach 90 min ist weder bei der LDH noch bei den Transaminasen ein Unterschied zu erkennen .
(S. auch Abb. 13 a - 15 b) .

Uneinheitlicher ist das Bild bei den beiden Versuchen mit Abbruch der Sauerstoffversorgung nach 1 std :

Im ersten Versuch kommt es bei sämtlichen Enzymen, die bis einschließlich der 2. std noch im Normbereich liegen, zu einem außerordentlich raschen Anstieg : LDH : 499 800 mU, GPT : 50 260 mU, GOT : 68 670 mU (3-h-Werte, bezogen pro Leber) .

Beim 2. Versuch dieser Gruppe steigen die Transaminasen dagegen sofort bei Einsetzen des O₂-Stopps

an bis zu einem Maximum bei 90 Minuten, sinken dann bis zum 2 1/2-h-Wert in den Normbereich ab und steigen schließlich in der 3. Stunde bis auf 2030 mU / Leber (GPT) bzw. 714 mU / Leber (GOT) an.

Die LDH dagegen erreicht ohne Peak in exponentiellem Anstieg einen 2-h-Wert von 55 000 mU und einen 3-h-Wert von 500 000 mU / Leber.

3. Zusammenfassung der Befunde. Folgerungen

Es wäre zu erwarten, daß die Schädigung durch den Sauerstoffmangel umso größer ist, je früher die Anoxie einsetzt. Diese Erwartung konnte durch unsere Versuche nicht bestätigt werden (S. auch S. 51 - 52).

Die Folgen des O₂-Mangels wirkten sich auf die Leberfunktion deutlicher aus als auf die Leberstruktur. So verliert die Leber ihre Fähigkeit, die Glukosekonzentration im Perfusionsmedium konstant zu halten, sobald der Sauerstoff abgestellt wird. Unter anoxischen Bedingungen wird auch die Sekretionsfähigkeit für Galle geringer und die BSP-Halbwertszeiten werden länger, was freilich einfach eine Folge der verminderten Gallensekretion sein kann.

Die Zeichen der Zellschädigung dagegen sind nicht ausgeprägt. Zwar kommt es unmittelbar nach Abbruch der Sauerstoffversorgung mit einer Ausnahme in allen Fällen zum Anstieg des aus der Leber stammenden Kaliums im Perfusionsmedium (Vergl. Abb. 12a). Bei der großen Streuung der Leberkaliumwerte sind diese Konzentrationserhöhungen jedoch nicht hinreichend deutlich, obwohl die Änderungen der Kaliumkonzentrationen im Perfusionsmedium als Kriterium für die Messung des Schädigungsgrades prinzipiell geeignet sind (67) .

Unempfindlich auf die anoxische Perfusion erwies sich der Enzymaustritt :

Der LDH-Austritt verläuft in 3 Versuchen ohne Anzeichen einer zusätzlichen Schädigung, bei einem 4. Versuch ist lediglich der 3-h-Wert nach zweistündiger sauerstoffloser und bis dahin unauffälliger Perfusion erhöht. Bei einem weiteren Versuch steigt die LDH-Konzentration erst 1 - 1 1/2 Stunden nach Beendigung der O₂-Zufuhr überdurchschnittlich an. In 2 weiteren Fällen war der LDH-Anstieg von Anfang an übermäßig hoch. Hier zeigen auch die Transaminasen einen stark erhöhten Enzymaustritt, so daß auf eine überdurchschnittlich hohe Operationsschädigung geschlossen werden kann.

Die Transaminasen verhalten sich ansonsten in allen Versuchen unauffällig und zeigen keine Reaktion auf die Anoxie.

Wenn man berücksichtigt, daß selbst bei 2 1/2stündiger sauerstoffrier Perfusion von den Lebern nicht mehr Enzyme abgegeben wurden als während Perfusionsversuchen mit einwandfreier O₂-Zufuhr, so ist eine anoxische Leberzellschädigung unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar gewesen.

Ein Leistungsabfall des Leberparenchyms ist dagegen erkennbar geworden.

Unter dieser Voraussetzung müssen die ausstehenden Versuche mit Endotoxinen ausgewertet werden:

Eine Zellschädigung durch Anoxie wird aufgrund der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht zu erwarten sein. Dagegen könnte sich ein anoxischer Effekt durch Endotoxineinwirkung am Leistungsabfall der Leber erkennen lassen.

4. Diskussion

Über das Verhalten der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber bei Anoxie liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor (56 - 60, 66, 67) .

Daß auch eine längere Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr von der Leber erstaunlich gut toleriert wird, haben u.a. auch neuere von KESSLER durchgeführte Untersuchungen bei Anoxiezeiten von 60 min ergeben (68 - 70):

Der intrazelluläre pH-Wert bleibt nahezu konstant (73), der ATP-Spiegel nimmt nur geringfügig ab (72) und die elektronenmikroskopische Feinstrukturanalyse zeigt lediglich vereinzelte Vakuolen im Zytoplasma sowie teilweise leichte Schwellungen des Interchristalraumes der Mitochondrien (70) . Voraussetzung zur Erhaltung der morphologischen Integrität unter anoxischen Verhältnissen ist aber eine aufrecht erhaltene Perfusionsrate oberhalb des kritischen Wertes von ungefähr 2,3 - 2,7 ml / min / g (73) und ein ausreichend gepuffertes Medium. Unter diesen Bedingungen werden die bei der anaeroben Glykolyse entstehenden Wasserstoff-Ionen weggespült, bevor es zur Entstehung einer Azidose kommen kann, die durch Erhöhung der Zellmembranpermeabilität zur Schädigung der Zelle führt.

Bei einer Ischämie dagegen treten bereits nach wenigen Minuten massive Veränderungen an der Leber auf (68, 70) . Denn die intrazellulär entstehende Lactatzidose führt hier zu einer teilweisen Depolarisation der Zellmembran mit Natrium-Einstrom und Kalium-Ausstrom. Die Ionenpumpe wird dadurch unter ATP-Verbrauch

aktiviert. Der Verlust energiereicher Phosphate bedingt darn sehr rasch schwerste Zellschädigungen.

Wir waren zwar bemüht, einen ausreichenden Flow aufrechtzuerhalten, haben aber die aktuelle Perfusionsrate nicht messen können. So könnte die in einigen Fällen aufgetretene Leberzellschädigung erst durch eine zusätzliche, unemerkt gebliebene Abnahme der Perfusionsrate zur experimentell erzeugten Anoxie zustande gekommen sein.

Ziel unserer Versuche ist es gewesen, durch den Abbruch der Sauerstoffversorgung ein Modell zu schaffen, mit dem wir die unter dem Einfluß von Endotoxin erwartete Verschlechterung der Leberparenchymversorgung u.a. auch mit Sauerstoff hätten vergleichen können (S. auch S. 16). Der Nachweis einer für ein solches Modell geeigneten Leberzellschädigung infolge Anoxie ist jedoch nicht möglich gewesen. Auf eine weitere Beschäftigung mit dem Verhalten der Leber unter den Bedingungen der anoxischen Perfusion haben wir daher verzichtet, denn im Mittelpunkt unserer Fragestellung stand ja das Verhalten der perfundierten Leber unter der Einwirkung von Endotoxinen.

4. Anhang zur 2. Versuchsreihe

Erläuterungen zu den Abbildungen 10 - 15b

Die Pfeile bezeichnen den Beginn der anoxischen Phase.

Es bedeuten: ✕ — Abbruch der O_2 -Versorgung nach 30 min

◻ — Abbruch der O_2 -Versorgung nach 60 min

□ — Abbruch der O_2 -Versorgung nach 90 min

Abb. 10 : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat während der Perfusion in mg%.

Abb. 11 : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen in ml, addierend aufgetragen.

Abb. 12a : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums im Perfusat in mval / Leber. Darstellung der Einzelversuche.

Abb. 12b : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums im Perfusat in mval / Leber. Darstellung der Mittelwerte.

Abb. 13a : LDH- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche.

Abb. 13b : LDH- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte.

Abb. 14a : GPT- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche.

Abb. 14b : GPT- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte.

Abb. 15a : GOT- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche.

Abb. 15b : GOT- Enzym Austritte in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte.

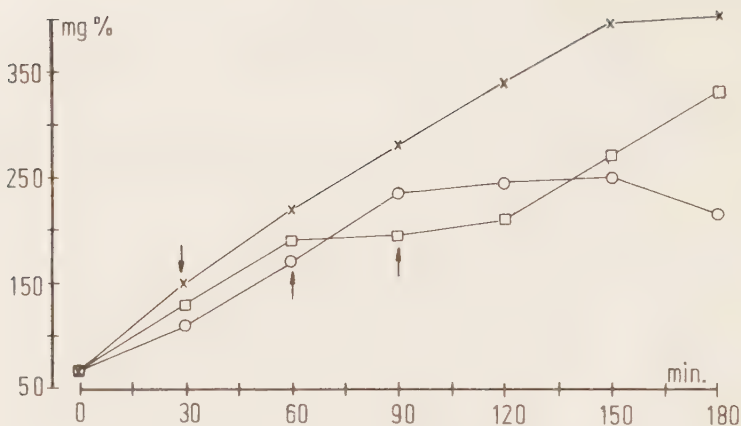


Abb. 10 : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat (Mittelwertskurven). Die Pfeile geben den Zeitpunkt des Anoxiebeginnes an .

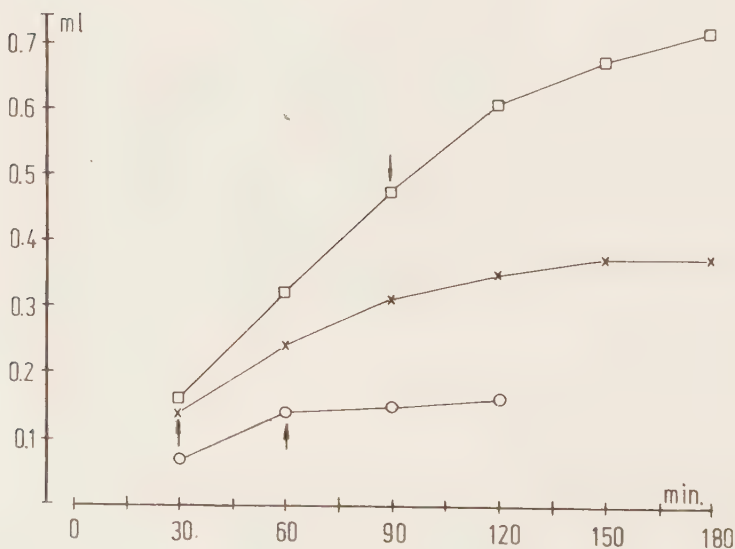


Abb. 11 : Zeitlicher Verlauf der sezernierten Gallenmengen, addierend aufgetragen. Die Pfeile bezeichnen den Beginn der anoxischen Phase.

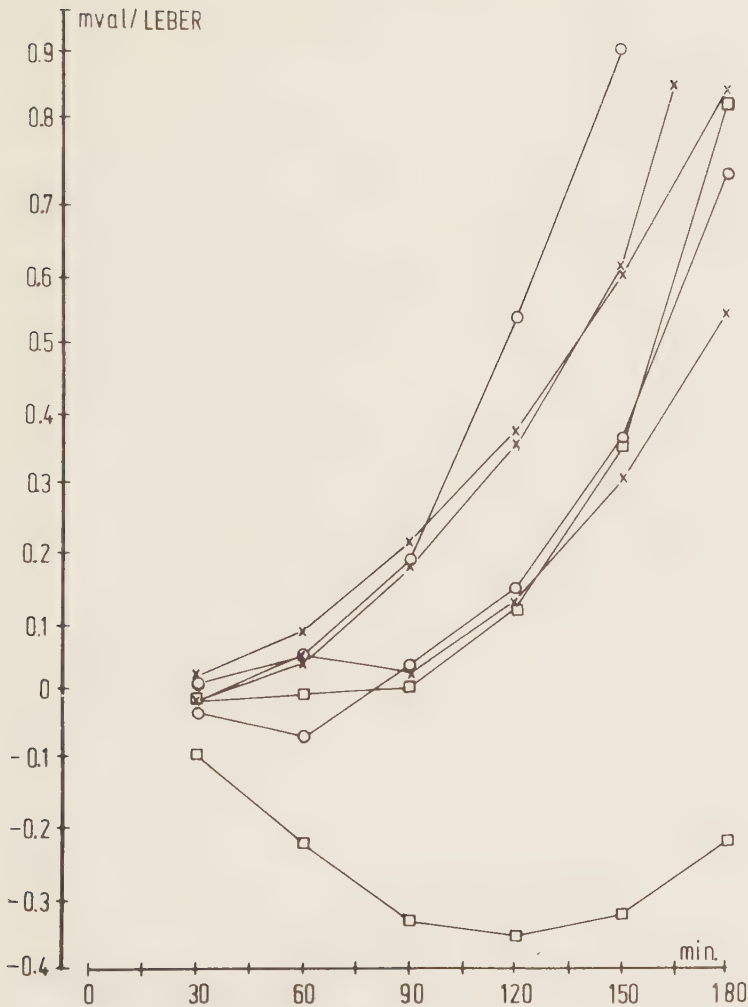


Abb. 12a : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums während der Perfusion .
 Darstellung der Einzelversuche. Es bedeuten :
 x — x Abbruch der O₂-Versorgung nach 30 min
 o — o " " " " " " " " 60 "
 □ — □ " " " " " " " " 90 "

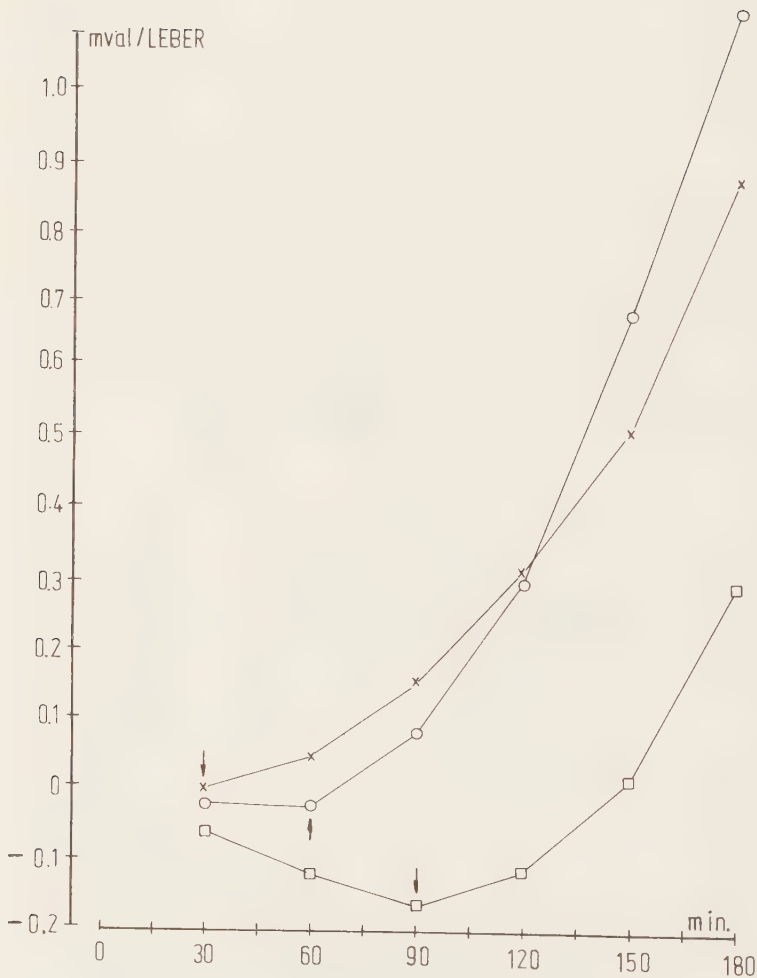


Abb. 12b : Konzentrationsänderungen des aus der Leber stammenden Kaliums während der Perfusion. Darstellung der Mittelwerte. Die Pfeile geben den Beginn der anoxischen Phase an.

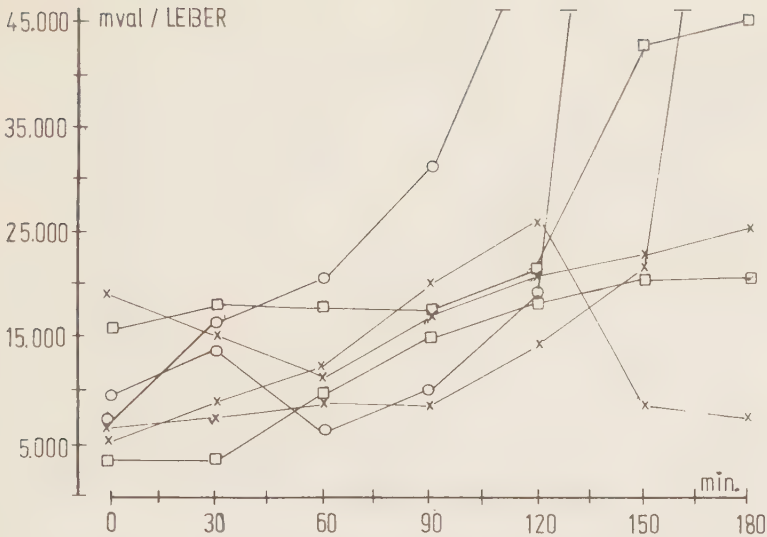


Abb. 13a : LDH-Enzymaustritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche. Es bedeuten : x — O₂-Stopp nach 30 min, o — O₂-Stopp nach 60 min, □ — O₂-Stopp nach 90 min .

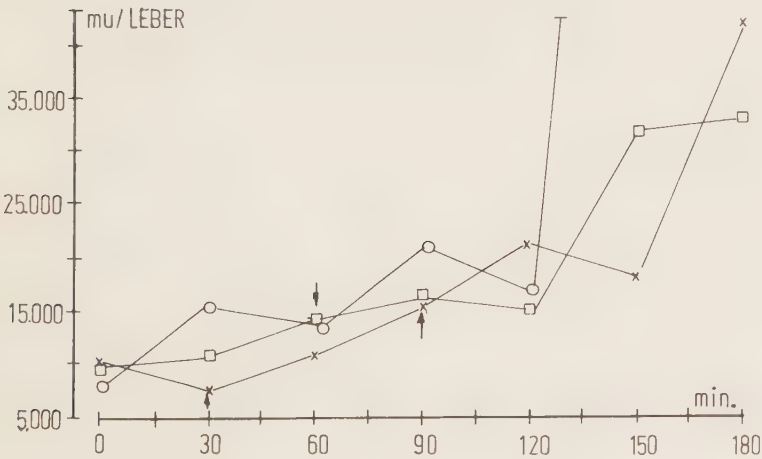


Abb. 13b : LDH-Enzymaustritt in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte. Die Pfeile bezeichnen den Beginn der anoxischen Phase.

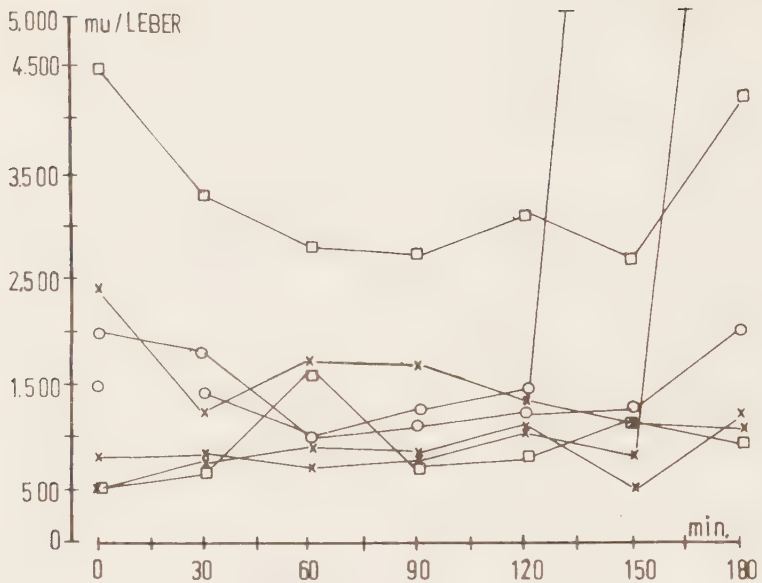


Abb. 14a : GPT-Enzymaustritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche. Es bedeuten :
 x — O_2 -Stopp nach 30 min, $\square$ — O_2 -Stopp nach 60 min, $\circ$ — O_2 -Stopp nach 90 min .

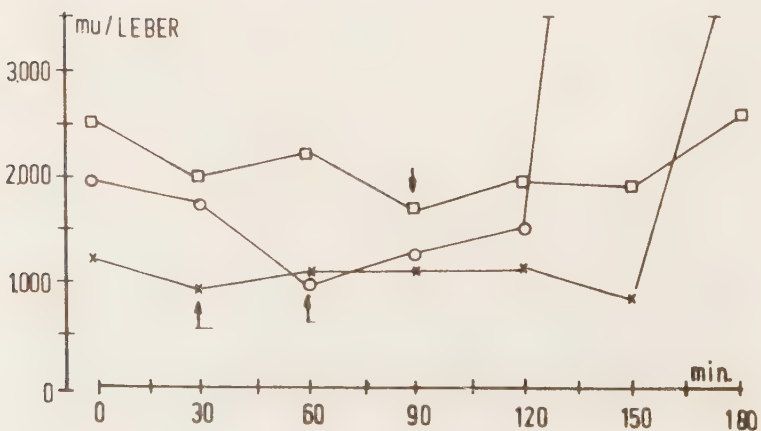


Abb. 14b : GPT-Enzymaustritte in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte. Die Pfeile bezeichnen den Beginn der anoxischen Phase.

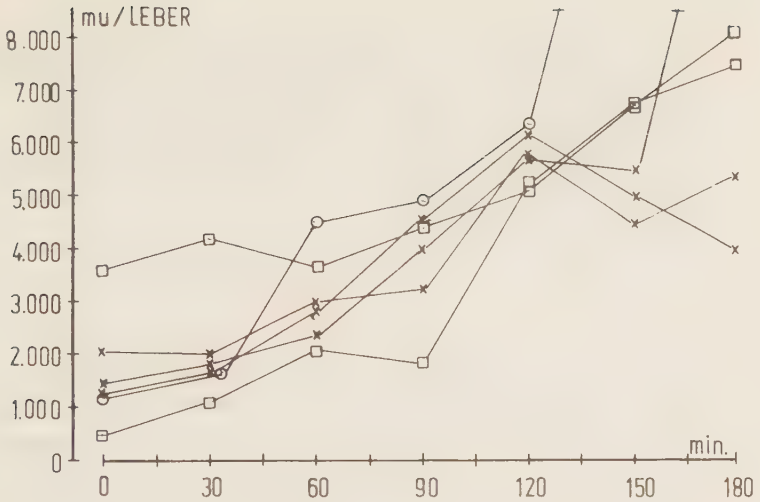


Abb. 15a : GOT-Enzymaustritte in mU / Leber. Darstellung der Einzelversuche. Es bedeuten: x — O₂-Stopp nach 30 min, o — O₂-Stopp nach 60 min, □ — O₂-Stopp nach 90 min.

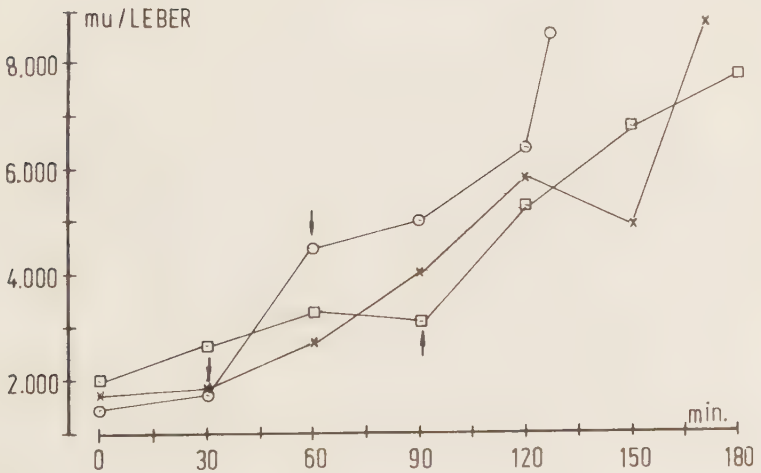


Abb. 15b : GOT-Enzymaustritte in mU / Leber. Darstellung der Mittelwerte. Die Pfeile bezeichnen den Beginn der anoxischen Phase.

D. 3. Versuchsreihe (Hauptversuche)

Untersuchungen über Struktur- und Funktionsänderungen der Leber nach Zugabe eines Endotoxinpräparates ohne und mit Blockade des retikuloendothelialen Systems durch Tuscheartikel am Modell der isolierten perfundierten Rattenleber

I. Auswertung

Zur Auswertung faßten wir die Konzentrationsänderungen der 1. std (Perfusion ohne Endotoxinzugabe) zusammen und setzten diesen Wert gleich 0. Die halbstündig ermittelten Konzentrationsänderungen während der folgenden beiden Stunden (Zeitdauer der Endotoxineinwirkung) sind auf diesen 1-h-Wert bezogen.

1. Ergebnisse

a. Glucose

Bei den Versuchen ohne Tusche steigt die Glucosekonzentration während der ersten 90 min von 52 mg% (Ausgangskonzentration im Perfusionsmedium) um 73 mg% an und fällt dann bis zum Perfusionsende linear um ca. 25 mg% ab (Mittelwertskurve aus allen Versuchen).

Wie Abb. 16 a zeigt, besteht bei den Versuchen ohne Tusche keine Beziehung zwischen dem Glukosespiegel und der zugegebenen Endotoxinmenge.

Bei den Versuchen mit Tusche zeigten sich dagegen bereits 30 min nach Endotoxinzugabe Abnahmen der Glukosekonzentration, deren Stärke direkt proportional zur Höhe der zugegebenen Endotoxindosis ist (Abb. 16 b). Die Glukoseabnahme im Perfusionsmedium bei den Versuchen mit endotoxininkubiertem Plasma (E.-Plasma) war dabei keinesfalls höher, als es bei Zugabe der entsprechenden Endotoxinmenge allein (ca. 0,8 mg) zu erwarten gewesen wäre.

b. Gallenmengen

Die normale Leber ist in der Lage, während der gesamten Perfusionsdauer Galle zu produzieren, wobei jedoch die Gallesekretion im Lauf der Perfusion deutlich abnimmt.

Die Galleproduktion bei den Versuchen ohne Tusche liegt während der ersten beiden Stunden der Perfusion erheblich über den bei den Versuchen mit Tusche erhaltenen Gallenmengen. Der Unterschied verringert sich während dieser Zeit jedoch beträchtlich und verschwindet während der letzten Stunde praktisch vollkommen :

	30-min-Wert	120-min-Wert	180-min-Wert
ohne Tusche	122	49	10
mit Tusche	75	41	16
Mittelwerte	98	45	13

Tab. 4 : Mittelwerte der halbstündlich sezernierten Gallenmengen in μ l .

Wie die Abb. 17 zeigt, ist weder bei den Versuchen ohne noch bei denen mit Tuscheanwendung ein eindeutiger Endotoxineffekt zu erkennen.

c. BSP - Clearance

Entsprechend dem in die Galle sezernierten BSP nimmt die Bromsulfthaleinkonzentration des Mediums ständig ab (Abb. 18), wobei bei der gesunden Leber Halbwertszeiten zwischen 36 und 66 min gemessen wurden. Die zeitlichen Verläufe der BSP - Extinktionsabnahmen im Medium lassen sich in keine überzeugende Beziehung zu den unterschiedlichen Endotoxinkonzentrationen setzen.

d. NaOH - Verbrauch

Der NaOH - Verbrauch sinkt während der ersten beiden Stunden kontinuierlich ab (von 0,9 ml pro 1/2 std auf 0,3 ml pro 1/2 std) und steigt in der letzten Stunde dann wieder geringfügig um ca. 0,1 ml an. Auf eine weitere Analyse des NaOH - Verbrauches mußte verzichtet werden, da zu viele Ergebnisse durch Störung des Titrationsautomaten verfälscht waren.

e. Kalium

Wie aus Abb. 19 a und b hervorgeht, ist der Kaliumaustritt bei den Versuchen mit hohen Endotoxindosen ab der zweiten Stunde deutlich erhöht.

Dies gilt für die Versuche ohne und mit Tuscheanwendung gleichermaßen.

Eine Analyse der diesen Mittelwerten zugrundeliegenden Einzelversuche zeigt, daß Zeitpunkt und Höhe des Kaliumaustrittes sehr gut mit den Enzymaustritten übereinstimmt (Vergl. Abb. 19 - 22).

Diese beiden Parameter für eine Zellschädigung werden daher auf den folgenden Seiten gemeinsam diskutiert.

f. Enzyme

Die Enzyme LDH, GPT und GOT weisen während der ersten 90 - 120 min nur einen recht geringen Anstieg auf. Erst in der letzten Stunde erhöht sich dieser Enzymaustritt erheblich. Der Enzymanstieg ist bei den tuscheblockierten Lebern deutlich stärker. Er soll unter " Tuscheinwirkungen " bei der statistischen Auswertung eingehend besprochen werden (S. 72 - 73) .

Bei den gleichen Einzelversuchen weisen alle 3 Enzyme in sehr guter Übereinstimmung erhöhte Enzymaustritte zum gleichen Zeitpunkt auf (Vergl. Abb. 20 - 22) . In Tabelle 5 (S. 64) ist für jeden Versuch der Beginn erhöhter Enzymaktivitäten angegeben.

Bei einem spezifischen Wirkungsmechanismus des Endotoxins, wie er auf S. 15 diskutiert worden ist, wäre innerhalb derselben Gruppen bei den jeweiligen Parallelversuchen ein Schädigungseintritt etwa in gleicher Stärke und zur gleichen Zeit zu erwarten. Daneben müßte eine Dosis - Wirkungsbeziehung bestehen.

Diese 3 Bedingungen gleichzeitig sind in keiner einzigen Gruppe vollständig erfüllt.

Die Vulnerabilität der Leberzellen scheint bei größeren Endotoxindosen erhöht zu sein. Auch die vorherige Tuscheapplikation wirkt offenbar im gleichen Sinne. Unter zusätzlicher Berücksichtigung des in Stärke und Zeitpunkt so unterschiedlichen Schädigungseintrittes ergibt sich für die von uns gefundenen Schädigungen die folgende Theorie :

Es kommt durch die Endotoxinzugabe zu einer unspezifischen Einwirkung im Sinne einer me-

a. Versuche ohne Tusche

Schädigungs- eintritt	0 - 30*	30 - 60*	60 - 90*	90 - 120*
Kontrolle	- - -	- - -	- - -	- - -
0,25 mg E.	- -	(LDH,PT,OT) (LDH)	LDH,PT,OT	LDH,PT,OT
0,5 mg E.	- - -	- - -	- LDH,PT,OT -	- - -
1 mg E.	LDH,PT,OT (LDH,OT)		(PT)	LDH,OT
E.-Plasma	- - - -	- - LDH,PT,OT -	- LDH -	- PT, OT -

b. Versuche mit Tusche

Schädigungs- eintritt	0 - 30*	30 - 60*	60 - 90*	90 - 120*
Kontrolle	(PT), OT - - -	- - -	PT - - -	(LDH) - - -
0,25 mg E.	- -	(LDH,PT,OT)	- LDH,PT,OT	(PT)
0,4 mg E.	- (LDH) -	- -	- LDH,PT,(OT) -	(LDH),PT OT LDH,PT
0,5 mg E.	LDH,PT,OT (LDH)	LDH,PT,OT		
E.-Plasma	LDH,PT,OT -	-	(LDH,PT,OT)	

Tab. 5 : Übersichtstabelle. Die Enzymbezeichnungen LDH, PT (= GPT) und OT (= GOT) zeigen den Beginn erhöhter Enzymaktivitäten im Perfusionsmedium an. Die Buchstaben stehen in Klammern, wenn der betreffende Wert nicht hinreichend deutlich erhöht ist. Die Versuche mit $\leq 0,25$ mg Endotoxinzugabe unterschieden sich in ihrem Enzy austritt nicht wesentlich von den Kontrollversuchen . Daher wurden sie nicht in die Tabelle aufgenommen.

* Die Zahlen bezeichnen den Schädigungseintritt in Minuten nach Endotoxinzugabe.

chanischen Schädigung, z.B. indem die Endotoxinmoleküle sich zusammenballen und so die Leberkapillaren verstopfen. Die schlechteren Perfusionsergebnisse nach Tuscheapplikation ergeben sich dabei durch eine primäre Schwellung der tuschephagozytierenden RES- Zellen unter Einengung des Kapillarraumes mit sekundärer Verstopfung durch Endotoxinkonglomerate.

g. GLDH

Die GLDH - Aktivitäten im Perfusionsmedium steigen von 0,17 mU / ml (5-min-Wert) auf 1,25 mU / ml (3-std-Wert) . Hier besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchen ohne und mit Tusche. Die GLDH-Austritte waren im Allgemeinen so gering, daß im Rahmen der möglichen Meßgenauigkeit keine zum Schädigungsnachweis ausreichend hohen Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen auftraten.

h. Evans - Blue

Die Evans-Blau Extinktionen nehmen im Verlauf der Perfusion geringfügig zu. Es erscheint jedoch zweifelhaft, ob die benutzte Meßtechnik geeignet war, Konzentrationsänderungen des mit Evans - Blau markierten Albumins anzuzeigen. Wahrscheinlich wurden die Extinktionsänderungen durch unspezifische Faktoren verursacht.

2. Zusammenfassung

Eine teilweise Funktionsbeeinträchtigung des Leberparenchyms durch Endotoxingaben erscheint nach vorheriger Blockierung des RES

mit Tusche möglich. Ca. 30 min nach Zugabe des Präparates kommt es in direkter Abhängigkeit von der Höhe der Endotoxindosis zu einem Abfall der Glucosekonzentration im Perfusat. Auf die Gallenfunktion war dagegen keine Wirkung nachweisbar.

Die Kalium- und Enzymaustritte lassen die Vulnerabilität der Leberzellen nach Gabe größerer Endotoxindosen (mehr als 0,1 mg) insgesamt erhöht erscheinen, wobei die Tuscheapplikation vor Versuchsbeginn verschärfend wirkt. Der Zeitpunkt des Schädigungseintrittes und die Stärke der Schädigung weisen keine Beziehung zur Höhe der zugegebenen Endotoxinmenge auf. Auch der Verlauf der Zellschädigung bei den Experimenten gleicher Gruppen ist nicht einheitlich. Aus diesen Gründen liegt aller Wahrscheinlichkeit nach kein spezifischer Endotoxinmechanismus vor.

II. Auswertung der durchgeführten Versuche mit Hilfe des Modells der partiell hierarchischen Varianzanalyse (VA)

Im folgenden Teil der Arbeit überprüften wir die oben aufgeführten Ergebnisse mit Hilfe des Modells der partiell hierarchischen Varianzanalyse.

Sinn dieser Berechnungen ist nicht nur die mathematisch- statistische Sicherung der genannten Beobachtungen, sondern auch die Überprüfung auf mögliche Endotoxineffekte, die durch die Mittelwertbildungen überdeckt sein könnten. Daneben sollen auch komplexere Wechselbeziehungen zwischen zeitlichem Verlauf, Tuscheapplikation und Endotoxinkonzentration auf Signifikanz überprüft werden, deren komplizierte Zusammenhänge ohne die Anwendung statistischer Untersuchungen garnicht aufzudecken sind.

1. VA mit 4 Faktoren

Die Anwendung des Modells der partiell hierarchischen VA mit 4 Faktoren erforderte zur Untersuchung eines Endotoxineffektes nach Tuscheblockade des RES (Faktor D) die Zugabe jeweils gleicher Mengen Endotoxins zu den tuschefreien bzw. zu den entsprechenden tuscheblockierten Lebern. Aus diesem Grunde konnten für die rechnerische Auswertung nur folgende 8 Gruppen verwandt werden :

Kontrollgruppe (keine E.-Zugabe)	mit u.ohne Tusche
0,1 mg E., 1 h nach Perf.beginn	mit u.ohne Tusche
0,25 mg E., 1h nach Perf.beginn	mit u.ohne Tusche
10 ml E.-Plasma, 1 h nach Perf.beg.	mit u.ohne Tusche

Nicht berücksichtigt werden konnte somit die Gruppe mit 0,4 mg Endotoxin-Zugabe, da es hier bei den tuschefreien Versuchen keine entsprechende Gruppe gibt.

Weiterhin mußte jede Gruppe die gleiche Anzahl von Einzeltieren enthalten. Da hierbei die Gruppe mit der geringsten Anzahl verwertbarer Tiere (3 Stück)

maßgebend für die Größe aller Gruppen wurde, mußten innerhalb der 8 genannten Gruppen noch einige weitere Versuche herausfallen (Auswahl nach dem Zufallsprinzip) .

Auch alle Gruppen mit weniger als 3 Versuchen konnten hier nicht ausgewertet werden. Im einzelnen handelte es sich um die 1 mg Endotoxingruppe ohne Tusche, um die 0,5 mg Endotoxingruppe mit Tusche und um die 0,01 mg Endotoxingruppe mit Tusche (wodurch die 0,01 mg Endotoxingruppe ohne Tusche ihre Vergleichsgruppe verlor und ebenfalls für die 4 faktorielle VA ausschied) .

Des weiteren mußte auf alle Versuche verzichtet werden, deren Meßergebnisse nicht vollständig vorlagen oder die (z.B. infolge Schaumbildung im Perfusionssystem) vor Ablauf der vollen 3 stündigen Perfusionsdauer abgebrochen werden mußten.

Die Kontrollversuche zu den E.-Plasma-Gruppen (Gleichermaßen vorbehandeltes Serum, jedoch statt Endotoxinlösung gleiche Menge Krebs-Henseleit-Puffer) erübrigten sich, da hier selbst das endotoxinhaltige Plasma keinen Effekt zeigte.

So gingen schließlich lediglich 8 mal 3 = 24 Versuche von den insgesamt 59 Versuchen mit Endotoxinzugaben in die 4 faktorielle VA ein.

2. VA mit 3 Faktoren

Um möglichst doch alle durchgeführten Versuche in die statistische Auswertung einbeziehen zu können, bot sich - unter Verzicht auf den Faktor D (Tusche) - das Modell der partiell hierarchischen VA mit nur 3 Faktoren an. Hier testeten wir zunächst sämtliche Gruppen ohne Tusche gegeneinander aus und untersuchten dann in einem getrennten Verfahren alle Gruppen mit Tusche untereinander auf Signifikanz (jeweils 7 Gruppen) .

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß nun alle Gruppen in den Test einbezogen werden konnten. Auch die Zahl der Einzelversuche innerhalb der jeweiligen Gruppen konnte variabel gehalten werden, so daß bei der 3 faktoriellen VA die Gruppengröße zwischen 2 und 5 Tieren schwankt.

Das größere Material ermöglichte es, alle Versuche mit Verdacht auf operationsbedingte Schädigungen der Leber zu eliminieren. Die rechnerische Durchführung findet sich im Anhang zur statistischen Auswertung. Hierdurch und durch die teilweise größeren Gruppen sind die Ergebnisse der 3 faktoriellen VA wesentlich genauer und zuverlässiger als die Aussagen der VA mit 4 Faktoren. Daher wird der Schwerpunkt der Analysen und weiteren Untersuchungen vor allem auf den Ergebnissen der VA mit 3 Faktoren basieren.

Folgende Gruppen wurden miteinander verglichen :

a. ohne Tusche

Kontrollgruppe (ohne Endotoxin)	(3 Tiere)
0,01 mg E., 1h nach Perf.beg.	(3 ")
0,1 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(5 ")
0,25 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
0,5 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(4 ")
1,0 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
10 ml E.-Plasma, 1 h nach Perf.beg.	(5 ")

b. mit Tusche

Kontrollgruppe (ohne Endotoxin)	(4 Tiere)
0,01 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
0,1 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
0,25 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
0,4 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(3 ")
0,5 mg E., 1 h nach Perf.beginn	(2 ")
10 ml E.-Plasma, 1 h nach Perf.beg.	(2 ")

Es wurden die Konzentrationen an Glukose, BSP, Kalium, LDH, GPT und GOT im Medium in den halbstündlich entnommenen Proben verglichen. Die sezernierten Gallenmengen, der NaOH - Verbrauch, der G1DH-Enzymanstieg und die Evans-Blue Extinktionen wurden bei der 3 faktoriellen VA nicht mehr berücksichtigt, da

hier entweder keine entscheidenden Änderungen gegenüber der 4 faktoriellen VA zu erwarten sind oder weil methodische Fehler - wie im Falle der Laugentitration schon oben erwähnt - ohnehin keine sinnvolle Auswertung zulassen.

Die diskutierten Unterschiede zwischen der VA mit 4 und der mit 3 Faktoren beruhen auf unterschiedlich vielen verwertbaren Versuchen bei den beiden statistischen Modellen. Besser belegt sind die Ergebnisse der 3 faktoriellen VA, da hier aus den eingangs erwähnten Gründen 17 Versuche mehr ausgewertet werden konnten. Wie jedoch die auf insgesamt 41 Tiere erweiterte VA mit 3 Faktoren zeigt, bilden die in die 4 faktorielle VA eingegangenen 24 Tiere einen recht guten repräsentativen Querschnitt durch unser gesamtes Versuchsmaterial. Die Erweiterung um 17 Tiere läßt keine neuen Schlüsse zu, hilft aber, die bereits vorliegende Auswertung der vorangegangenen 4 faktoriellen VA zu stützen und ihre Interpretation zu ergänzen.)^x

Bei denjenigen Parametern, die - außer dem Faktor A - im F - Test keine weiteren statistisch signifikanten Faktoren enthielten, wird im folgenden die aus allen Versuchen gebildete Mittelwertskurve besprochen.

Falls sich bei einem Parameter jedoch für einen oder mehrer Faktoren aus dem F - Test signifikant unterschiedliche Gruppen ergeben, erfolgte eine Aufschlüsselung der Gruppen in Abhängigkeit von dem betreffenden Faktor. Mit Hilfe des Scheffé-Testes wurde(n) anschließend die jeweilig signifikante(n) Gruppe(n) und der Zeitpunkt des Signifikanzeintrittes festgestellt.

)^x Die F-Verteilungen für die einzelnen Parameter (4 faktorielle VA) finden sich auf S. 71, die zugrunde liegenden Mittelwerte auf S. 79. Die für die sonstige Auswertung (3 faktorielle VA) herangezogenen Mittelwerte sind auf den Seiten 80 - 87 tabellarisch aufgeführt.

Übersicht über die aus der 4 faktoriellen Varianzanalyse erhaltene F-Verteilung

Faktoren	Glukosekonz.	Gallenmengen	BSP - Medium	NaOH - Verbz.	Kalium	L D H
AB(C)D						
ACD	0,292	0,952	3,148*	1,275	1,479	1,500
AD	1,465	0,962	2,261	0,132	1,553	8,900*
AB(C)						
AC	0,833	1,268	9,604*	0,498	0,697	1,700
A	12,142*	25,555*	84,000*	7,217*	22,900*	12,700*
B(C)D						
CD	1,090	0,519	2,890	13,299*	1,063	1,400
D	1,548	2,064	4,100	0,804	2,630	8,800*
B(C)						
C	0,770	1,764	2,193	1,920	2,270	2,200

Faktoren	G P T	G O T	GLDH	Evans-Blue	F-Verteilung(Tabellenwerte)
AB(C)D					
ACD	1,074	1,129	1,128	1,620	1,82
AD	7,387*	9,938*	1,106	5,860*	2,30
AB(C)					
AC	1,354	1,149	1,005	2,550*	1,82
A	11,500*	18,400*	6,424*	22,600*	2,30
B(C)D					
CD	0,924	0,779	1,090	0,531	4,07
D	6,570*	7,350*	1,964	3,539	5,32
B(C)					
C	1,495	1,506	1,041	1,378	4,07

Tab. 6 : Es gelten: Faktor A = zeitl. Verlauf, Faktor B = Tiere, Faktor C = Endotoxingruppen, Faktor D = Tische. Die mit * markierten Werte bezeichnen die statistisch signifikanten Faktoren bzw. deren signifikante Wechselbeziehungen untereinander. Die angeführten Tabellenwerte der F-Verteilung stellen die zulässigen Grenzwerte für 5 % Sicherheitspunkte dar. Sie sind der Tafel in G.W.SNEDECOR : Statistical Methods, 1948, S. 222 - S.225 entnommen (65) .

3. Ergebnisse

a. Zeitlicher Verlauf (Faktor A)

Der zeitliche Verlauf über die 3 std Perfusionsdauer hinweg erwies sich erwartungsgemäß bei beiden varianzanalytischen Modellen bei allen Parametern und in allen Gruppen als hochsignifikant (Irrtumswahrscheinlichkeit durchwegs $\leq 1\%$). Hierin kommt die durch die Methode der Perfusion eintretende progredient verlaufende Schädigung sowie die durch die Probenentnahmen bedingte Volumenverminderung des Perfusionsmediums zum Ausdruck.

b. Tuscheeinwirkungen (Faktor D)

Bei den Enzymen LDH, GPT und GOT ergab sich nach der Tuscheinjektion 45 min vor Operationsbeginn bei der VA mit 4 Faktoren ein signifikant erhöhter Enzymaustritt im Vergleich zu den tusche-freien perfundierten Lebern (S. Abb. 20 - 22). Hier muß wohl an eine Schädigung des extramitochondrialen Raumes der Kupffer'schen Sternzellen durch die Aufnahme der Tuscheartikel gedacht werden. Diese Differenzen zwischen den beiden Mittelwertskurven verringern sich nach Zugrundelegung aller 41 Versuche jedoch beträchtlich :

	5-min-Wert	90-min-Wert	180-min-Wert	
4 fakt.VA	10 mU/ml	197mU/ml	3375mU/ml	LDH
3 fakt.VA	2 mU/ml	38mU/ml	1258mU/ml	
4 fakt.VA	2,8 mU/ml	24mU/ml	238mU/ml	GPT
3 fakt.VA	0,7 mU/ml	3,6mU/ml	95mU/ml	
4 fakt.VA	3 mU/ml	29,5mU/ml	296mU/ml	GOT
3 fakt.VA	1 mU/ml	3,3mU/ml	105mU/ml	

Tab. 7 : Differenzen zwischen den Mittelwertskurven der Versuche ohne und der mit Tusche bei der 4faktoriellen VA (24 Vers.) u. bei der 3 fakt.VA (41 Vers.) (entsprechend dem Abstand der Kurven m und o (4 fakt. VA) bzw. m' und o' (3fakt. VA) der Abb. 23 a - c).

Die Experimente mit Tusche weisen jetzt einen weniger schnellen Anstieg auf und die ohne Tusche steigen etwas rascher, so daß die beiden entsprechenden Kurven fast 2 Stunden lang fast kongruent verlaufen und ihr Abstand zueinander bis zum Ende der Perfusionsdauer in den Bereich der biologischen Variabilität rückt.

Es scheint folglich die Signifikanz des Faktors Tusche bei der 4 faktoriellen VA im Falle der Enzyme im wesentlichen das Produkt einiger weniger Tuscheversuche zu sein, deren unspezifisch (?) hoch geschädigte Lebern einen Effekt vorgetäuscht haben. Erst die Hinzunahme weiterer normal verlaufener Versuche drückt die solchermaßen überhöhten Mittelwerte wieder in die Gegend des Normbereichs hinunter. Trotzdem bleibt eine größere Vulnerabilität der tuschebeladenen Leberzellen wahrscheinlich.

Eine weitere statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen dem zeitlichen Verlauf der Perfusion und der Tuscheapplikation ergab sich außerdem bei den Evans-Blue Extinktionen. Sie wurde aus den auf S.36 angeführten Gründen nicht weiter berücksichtigt.

c. Wechselwirkung zwischen Endotoxingruppen und Tuscheapplikation (CD)

Diese Wechselbeziehung wurde lediglich beim NaOH-Verbrauch signifikant. Der uncharakteristische zeitliche Verlauf bei der Titration legt den Verdacht auf methodische Fehler beim Messen des Laugenverbrauches nahe. Denkbar sind ein wiederholt beobachtetes Mittitrieren von Luft sowie Laugenverlust durch undichte Stellen des Titriersystems. Daher sind die Ergebnisse des NaOH-Verbrauches nur bedingt verwertbar.

d. Wechselbeziehungen zwischen zeitlichem Verlauf und Endotoxinkonzentrationen (AC) sowie zwischen zeitl. Verlauf, Endotoxinkonzentrationen und Tuscheapplikation (ACD)

Die Beziehung ACD wird lediglich bei der BSP-Clearance rechnerisch signifikant. Die Beziehung AC ist bei der BSP-Clearance und den Evans-Blau Extinktionen signifikant. Eine Analyse der Mittelwertskurven läßt kein auch nur einigermaßen einheitliches Verhalten zu den jeweiligen Endotoxinkonzentrationen erkennen und auch die zugrundeliegenden Einzelkurven sind untereinander nicht einheitlich. Hinzu kommt das unauffällige Ergebnis bei den anderen Parametern. Besonders die BSP-Konzentrationen in der sezernierten Galle, die in einem gesonderten Verfahren miteinander in Beziehung gesetzt wurden, brachten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Wegen der engen Verknüpfung zwischen der BSP-Konzentration im Medium und der in der Galle spricht auch dieser Befund nicht für ein endotoxinbedingtes Signifikantwerden von AC und ACD.

So scheinen bei diesen Wechselbeziehungen methodische Unzulänglichkeiten die varianzanalytischen Berechnungen entscheidend beeinflußt zu haben.

e. Endotoxinwirkung (Faktor C)

Die Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den Endotoxin- bzw. E.-Plasmagruppen brachten in der 4 faktoriellen VA ebenso wie die der Endotoxingruppen untereinander weder bei den Versuchen ohne Tusche noch bei denen mit Tusche hinreichend signifikante Ergebnisse (Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$). Damit konnte auf keinen der gewählten Parameter ein sicherer Endotoxineinfluß nachgewiesen werden. Auch die Blockade des RES durch

Tusche zeigte kein günstigeres Ergebnis. Signifikante Wechselwirkungen zwischen dem zeitlichen Verlauf und der Endotoxinkonzentration bei der BSP-Clearance und der Evans-Blue Extinktion sind bereits oben diskutiert worden.

Bei der VA mit 3 Faktoren wird der Faktor C (Gruppen unterschiedlicher Endotoxinkonzentrationen) im Gegensatz zur 4 faktoriellen VA bei den Kaliumkonzentrationen der Gruppe ohne Tusche und bei den LDH-Werten der Gruppe mit Tusche signifikant. Allerdings liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit in beiden Fällen bei immerhin 5 % und keiner der anderen Parameter stützt dieses Ergebnis. Laut Scheffé - Test kommt im 1. Fall (Kalium ohne Tusche) als Ursache für diese Signifikanz lediglich die Gruppe mit 0,25 mg Endotoxinzugabe in Betracht (S. auch Abb.19 a) . Sowohl die Versuche höherer Endotoxinkonzentrationen (1 mg) als auch die mit geringeren Endotoxinzugaben liegen dagegen unauffällig im Bereich der normalen biologischen Variabilität.

Im 2. Fall (LDH mit Tusche) verursacht die Gruppe mit 0,5 mg Endotoxinzugabe das signifikante Ergebnis im F-Test . Da die Gruppe aus nur 2 Tieren besteht und außerdem die Versuche mit 0,4 mg Endotoxinzugabe völlig ergebnislos verliefen, bleibt in beiden Fällen eigentlich nur der Schluß auf ein unspezifisches Signifikantwerden des Faktors C im F-Test.

f. Wechselbeziehung zwischen zeitlichem Verlauf und Endotoxingruppe (AC)

Der F-Test weist für Kalium und für die Enzyme bei den Tuscheversuchen eine deutliche Signifikanz im zeitlichen Verlauf zwischen den einzelnen Endotoxingruppen auf. In allen Fällen läßt sich jedoch mit dem Scheffé-Test zeigen, daß lediglich die 3-h-Werte als nicht mehr parallel zu den entsprechen-

den Werten der Kontrollgruppe gelten müssen, während die Abweichungen der 5-min-Werte bis einschließlich 2 1/2-h-Werte durchaus noch zufällig sein können. Weiterhin fällt laut Scheffé-Test immer nur in einer einzigen bis maximal in zweien der 7 Gruppen dieser letzte Wert aus der Reihe. Eine Aufschlüsselung der infrage kommenden 3-h-Mittelwerte ergibt die folgende Tabelle (S.auch Abb. 19 a, 20 a, 21 a, 22 a) :

	0,25 mg	0,4 mg	0,5 mg	E.-Plasma	Kontr.	
1.Vers.	6,95	10,80*	11,90*	9,15	7,30	Kalium
2.Vers.	17,10*	9,45*	11,70*	6,45	5,00	
3.Vers.	-	8,25	-	-	8,90	
4.Vers.	-	-	-	-	6,30	
MW)*	12,00	9,50	11,80	7,80	6,85	
1.Vers.	411	626	9610*	9260*	324	LDH
2.Vers.	8670*	974	9500*	748	192	
3.Vers.	-	2510*	-	-	785	
4.Vers.	-	-	-	-	192	
MW)*	4540	1370	9555	5004	498	
1.Vers.	38	94	900*	850*	140	GPT
2.Vers.	420*	363*	490*	58	5	
3.Vers.	-	112	-	-	50	
4.Vers.	-	-	-	-	14	
MW)*	229	190	695	454	52	
1.Vers.	94	118	1650*	910*	144	GOT
2.Vers.	500*	742*	620*	102	30	
3.Vers.	-	192	-	-	74	
4.Vers.	-	-	-	-	34	
MW)*	297	351	1135	506	70	

Tab. 8 : Aufschlüsselung der Mittelwerte in die zugrundeliegenden Einzelwerte. Dargestellt sind die 3-h-Endwerte der Endotoxingruppen mit 0,25mg, 0,4 mg, 0,5 mg und E.-Plasma. Die Markierungen (*) bezeichnen jeweils die 5 am stärksten erhöhten Einzelversuche (Erklärungen S. Text). Angaben in mval/l (Kalium) bzw. mU / ml (Enzyme).

MW)* = Mittelwert

Markieren wir in dieser Tabelle jeweils die 5 Einzelversuche mit den am stärksten erhöhten Endwerten mit einem * , so zeigt sich :

1. Es handelt sich bei allen 4 Parametern im wesentlichen um die gleichen Versuche.

2. Der erhöhte Mittelwert bei der Gruppe mit 0,25 mg Endotoxinzugabe und bei der mit E.-Plasmazugabe wird ausschließlich durch nur einen Versuch dieser Gruppen erzielt. Der andere, unter gleichen Bedingungen durchgeführte Versuch dagegen liegt jeweils mit allen 4 Parametern innerhalb des Normbereiches. Eine Endotoxinwirkung ist somit in diesen Fällen wenig wahrscheinlich, da dann ja auch der Parallelversuch entsprechende Schädigungen zeigen müßte.

3. Bei der Gruppe mit 0,4 mg Endotoxinzugabe handelt es sich in allen 3 Fällen zwar um gering erhöhte Werte, der Scheffé-Test ist jedoch bei keinem der Parameter signifikant. Das bedeutet, daß die Kurven noch parallel zu denen der Kontrollgruppe verlaufen. Eine Endotoxinwirkung ist somit auch hier statistisch nicht nachweisbar.

Eine Hypothese zur Erklärung der hier diskutierten Schädigungen findet sich auf S. 63 - 65 .

4. Anhang zur 3. Versuchsreihe (Hauptversuche)

- a. Mittelwertstabelle aus allen 24 in die
4 faktorielle Varianzanalyse eingegangenen
Versuchen.
- b. Mittelwertstabellen aus allen 41 in die
3 faktorielle VA einbezogenen Versuchen.
 - 1. Für Versuche ohne Tuscheanwendung
 - 2. Für Versuche mit Tuscheanwendung
- c. Umrechnungen der in das Perfusionsmedium
ausgetretenen LDH-, GPT-, und GOT- Mengen
von mU / ml auf mU / Leber .
- d. Legenden zu den graphischen Darstellungen
der 3. Versuchsreihe.
- e. Graphische Darstellungen zu den Versuchen
der 3. Versuchsreihe.

Übersicht über die Mittelwerte aus allen 24 in die 4 faktorielle Varianzanalyse eingegangenen Versuchen

Zeit nach	Glukose-Gallen-BSP- konz. (mg%)	Glukose- menge (μl)	NaOH- Clearance (Extinkt.) (ml)	NaOH- Verbr. (ml)	Kalium (mval/l)	LDH ohne mit Tusche (mU/ml)	LDH ohne mit Tusche (mU/ml)	GPT ohne mit Tusche (mU/ml)	GPT ohne mit Tusche (mU/ml)	GOT ohne mit Tusche (mU/ml)	GLDH mU/ml	Evans- Blue (Extinkt.)
5 min	60,8	-	0,113	-	5,53	118	128	12	9	21	18	0,159
30 min	103,7	82,1	0,095	0,923	5,13	141	179	10	13	21	25	0,163
60 min	131,5	73,8	0,076	0,627	5,24	157	275	12	17	26	32	0,187
90 min	147,2	59,7	0,063	0,421	5,66	190	487	13	37	34	63	0,190
120 min	134,2	43,0	0,051	0,288	5,98	235	973	16	75	47	100	0,190
150 min	118,4	27,1	0,049	0,282	6,90	297	2204	22	179	59	251	0,205
180 min	105,2	11,6	0,050	0,379	7,97	378	3753	35	273	68	364	0,226

Da zwischen den 2 x 4 getesteten Gruppen unterschiedlicher Endotoxinkonzentrationen kein signifikanter Unterschied nachweisbar war, wurde aus den Mittelwerten aller Gruppen ein Gesamtmittelwert errechnet. Bei einigen Parametern (LDH, GPT und GOT) bestanden jedoch statistisch zu sichernde Differenzen zwischen den Versuchen ohne und mit Tuscheanwendung. Hier mußten die Mittelwerte der tuschefrei perfundierten und der tuscheblockierten Lebern (je 12 Versuche) getrennt aufgeführt werden.

Mittelwertstabellen aus allen 41 in die Auswertung
(VA mit 3 Faktoren) einbezogenen Versuchen

Aufgeführt sind die Mittelwerte der ausgewerteten Parameter aus den 24 Versuchen ohne Tuscheanwendung (7 Gruppen mit unterschiedlich hohen zugegebenen Endotoxindosen) und aus den 17 Versuchen mit Tuscheblockade des RES (ebenfalls 7 Gruppen). Die Zusammensetzung der Gruppen aus den jeweiligen Einzelversuchen geht aus der Aufstellung auf S. 69 hervor.

1. Versuche ohne Tuscheanwendung

a. Glukose (mg%)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontrolle	69	87	106	104	98	89	92	
0,01mg E.	56	91	117	115	110	106	107	
0,1mg E.	48	84	130	147	152	147	136	
0,25 mg E.	40	74	94	91	83	64	44	
0,5 mg E.	53	115	153	147	144	103	110	
1 mg E.	54	112	149	165	156	161	154	
E-Plasma	46	93	128	163	149	125	106	
MW)*	52	108	125	133	127	113	109	

b. Gallenmengen (μ l)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	-	120	113	97	65	33	12	
0,01 mg E.	-	133	92	62	77	48	16	
0,1 mg E.	-	122	81	66	61	43	15	
0,25mg E.	-	100	90	85	15	3	0	
0,5 mg E.	-	163	115	92	56	19	4	
1 mg E.	-	147	72	82	11	3	1	
E-Plasma	-	110	92	68	61	42	25	
MW)*	-	128	95	79	49	27	10	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

c. BSP-Medium (Extinktionen)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontrolle	0,199	0,149	0,096	0,061	0,040	0,028	0,035	
0,01mg E.	0,100	0,069	0,049	0,039	0,029	0,023	0,027	
0,1 mg E.	0,101	0,078	0,073	0,066	0,039	0,040	0,035	
0,25 mgE.	0,100	0,074	0,046	0,024	0,024	0,022	0,025	
0,5 mg E.	0,146	0,065	0,041	0,047	0,020	0,020	0,021	
1 mg E.	0,236	0,185	0,140	0,123	0,117	0,123	0,127	
E.Plasma	0,102	0,089	0,053	0,034	0,021	0,012	0,014	
MW)*	0,141	0,101	0,071	0,056	0,041	0,038	0,040	

d. NaOH-Verbrauch (ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	-	1,242	0,751	0,585	0,464	0,605	0,565	
0,01mgE.	-	1,099	0,940	1,171	0,559	0,592	0,419	
0,1 mg E.	-	1,292	0,801	0,339	0,371	0,342	0,459	
0,25mg E.	-	0,131	0,172	0,171	0,239	0,320	0,320	
0,5 mg E.	-	1,800	0,572	0,574	0,685	0,666	0,605	
1 mg E.	-	0,764	0,673	0,465	0,584	0,582	0,552	
E.Plasma	-	1,315	0,606	0,557	0,456	0,446	0,557	
MW)*	-	1,092	0,645	0,552	0,480	0,508	0,495	

e. Kalium (mval / l)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	4,77	4,62	4,52	4,70	4,97	6,28	7,58	
0,01 mg	4,73	4,90	4,36	5,07	4,88	5,73	7,22	
0,1 mg E.	5,30	4,78	5,01	5,39	5,50	6,69	9,34	
0,25 mgE.	6,03	5,38	5,98	7,35	7,73	9,83	12,13	
0,5 mgE.	5,22	4,70	4,78	5,07	6,08	7,02	8,07	
1 mg E.	4,53	4,88	5,90	6,93	7,90	9,45	10,75	
E.Plasma	5,23	4,69	4,68	4,78	4,86	5,60	6,70	
MW)*	5,13	4,80	4,92	5,39	5,69	6,83	8,46	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

f. LDH (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	37	102	93	119	160	236	273	
0,01 mgE.	85	103	133	130	179	226	858	
0,1 mg E.	83	99	128	185	248	358	771	
0,25mg E.	23	50	93	149	263	990	2863	
0,5 mg E.	123	136	169	202	265	1132	2622	
1 mg E.	29	59	129	290	954	1938	3730	
E.Plasma	137	173	207	261	354	514	598	
MW)*	86	114	145	194	313	678	1413	

g. GPT (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	3,0	5,6	4,3	6,0	7,3	13,3	20,0	
0,01 mgE.	6,0	4,7	6,3	7,3	6,7	9,0	56,0	
0,1 mg E.	12,0	9,6	11,4	12,8	15,4	31,2	51,2	
0,25mgE.	3,5	5,5	7,0	11,5	12,0	55,5	236,0	
0,5 mg E.	9,3	10,5	11,3	12,3	14,3	56,8	152,0	
1 mg E.	3,5	4,0	9,5	22,5	109,5	273,0	462,0	
E.Plasma	9,0	13,6	12,4	16,4	25,8	34,6	62,2	
MW)*	7,6	8,7	9,5	12,6	22,8	53,3	116,6	

h. GOT (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	8,7	22,3	20,3	25,3	39,3	62,0	65,3	
0,01mgE.	10,7	14,7	16,3	25,7	32,3	41,3	106,3	
0,1 mg E.	17,0	16,4	27,8	36,6	55,0	81,0	115,0	
0,25 mgE.	13,5	10,5	24,0	30,5	54,0	130,5	241,0	
0,5mg E.	18,3	25,0	30,3	41,3	50,8	178,8	286,8	
1 mg E.	9,5	15,0	35,0	63,0	172,5	379,0	533,0	
E.Plasma	19,6	29,0	31,6	40,4	63,0	75,6	137,6	
MW)*	13,9	19,0	26,6	37,5	66,7	92,6	212,0	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

i. G1DH (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	0,30	0,40	0,37	0,57	0,53	0,97	1,17	
0,01mg E.	0	0,17	0	0	0,03	0,17	0,43	
0,1 mg E.	0,10	0,18	0,15	0,22	0,26	0,74	0,72	
0,25mg E.	0	0,25	0,25	0,40	0,05	0,55	0,60	
0,5 mg E.	0	0,02	0,10	0,28	0,25	0,92	1,42	
1 mg E.	0,10	0,00	0,05	0,40	0,30	2,20	4,15	
E.Plasma	0,22	0,20	0,30	0,40	0,30	0,84	0,94	
MW)*	0,10	0,18	0,18	0,32	0,25	0,91	1,35	

j. Evans-Blue (Extinktionen)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	0,165	0,183	0,140	0,151	0,159	0,183	0,186	
0,01mg E.	0,158	0,151	0,150	0,159	0,166	0,169	0,191	
0,1 mg E.	0,163	0,165	0,234	0,174	0,191	0,209	0,237	
0,25mg E.	0,142	0,156	0,160	0,171	0,176	0,189	0,240	
0,5 mg E.	0,209	0,190	0,204	0,226	0,262	0,302	0,359	
1 mg E.	0,222	0,249	0,244	0,223	0,278	0,298	0,272	
E.Plasma	0,166	0,151	0,153	0,254	0,262	0,263	0,268	
MW)*	0,175	0,178	0,183	0,194	0,213	0,230	0,250	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

2. Versuche mit Tuscheanwendung

a. Glukose (mg%)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	39	75	118	153	140	119	115	
0,01mgE.	46	70	93	102	104	110	105	
0,1 mg E.	39	74	103	112	95	81	64	
0,25mgE.	43	96	122	137	114	85	55	
0,4 mgE.	42	85	106	98	92	63	23	
0,5 mgE.	42	96	113	102	55	13	1	
E.Plasma	48	111	133	160	80	48	20	
MW)*	43	87	113	123	97	74	55	

b. Gallenmenge (μ l)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	-	76	64	48	35	31	26	
0,01mg E.	-	130	125	105	88	78	55	
0,1 mg E.	-	60	60	90	87	62	24	
0,25mgE.	-	87	75	45	20	0	0	
0,4 mg E.	-	74	55	68	18	8	2	
0,5 mg E.	-	25	25	7	0	0	0	
E.Plasma	-	75	70	42	36	20	7	
MW)*	-	75	53	58	41	28	16	

c. BSP-Medium (Extinktionen)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	0.113	0.097	0.087	0.082	0.076	0.067	0.074	
0,01mgE.	0.103	0.100	0.091	0.078	0.069	0.054	0.044	
0,1 mgE.	0.086	0.080	0.074	0.062	0.050	0.047	0.042	
0,25mgE.	0.105	0.098	0.087	0.075	0.070	0.074	0.072	
0,4 mgE.	0.109	0.101	0.088	0.086	0.072	0.072	0.078	
0,5 mgE.	0.116	0.103	0.093	0.087	0.085	0.096	0.102	
E.Plasma	0.116	0.107	0.089	0.079	0.079	0.075	0.073	
MW)*	0.102	0.098	0.087	0.079	0.072	0.069	0.070	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

d. NaOH-Verbrauch (ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	-	0,800	0,449	0,552	0,157	0,133	0,144	
0,01mg E.	-	0,663	0,206	0,218	0,313	0,171	0,448	
0,1 mg E.	-	0,222	0,095	0,141	0,071	0,113	0,127	
0,25mg E.	-	0,400	0,241	0,280	0,309	0,270	0,188	
0,4 mg E.	-	0,244	0,154	0,183	0,253	0,305	0,278	
0,5 mg E.	-	2,133	1,434	1,713	1,164	0,182	0,026	
E.Plasma	-	2,180	1,747	0,668	0,402	0,235	0,061	
MW)*	-	0,949	0,618	0,537	0,381	0,201	0,182	

e. Kalium (mval / l)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	5,36	5,54	5,48	5,56	6,10	6,88	6,88	
0,01mg E.	4,95	4,75	5,38	5,38	5,38	5,78	7,95	
0,1 mg E.	5,75	5,70	6,30	5,78	6,25	6,33	7,30	
0,25mg E.	6,55	5,68	5,63	6,75	8,55	9,03	12,03	
0,4 mg E.	5,22	4,98	5,60	6,00	6,97	8,72	9,50	
0,5 mg E.	5,15	5,10	5,80	7,43	9,15	10,58	11,80	
E.Plasma	4,88	5,02	5,55	6,30	6,60	6,93	7,80	
MW)*	5,39	5,27	5,65	6,09	6,89	7,70	8,81	

f. LDH (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	96	158	170	192	227	302	498	
0,01 mg E.	47	56	53	83	131	187	243	
0,1 mg E.	94	108	138	177	250	261	306	
0,25mg E.	102	154	201	252	380	2042	4541	
0,4 mg E.	65	103	134	206	285	413	1370	
0,5 mg E.	134	180	239	378	1721	7065	9555	
E.Plasma	47	68	102	387	1736	3508	5004	
MW)*	84	122	150	232	600	1681	2671	

)* MW steht für die aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

g. GPT (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	11,3	10,5	14,0	15,8	19,5	18,3	52,3	
0,01mg E.	3,0	3,0	2,0	3,0	4,0	5,5	10,0	
0,1 mg E.	7,0	8,0	10,0	7,5	9,5	17,0	19,0	
0,25mg E.	2,0	9,0	9,5	12,5	14,0	142,5	229,0	
0,4 mg E.	5,7	7,3	9,6	10,0	13,7	38,0	189,6	
0,5 mg E.	10,0	13,0	12,5	23,0	85,5	395,0	695,0	
E.Plasma	6,0	5,0	5,5	45,5	131,5	281,5	454,0	
MW)*	6,9	8,2	9,6	16,2	35,8	110,0	211,3	

h. GOT (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	23,0	23,5	31,8	44,3	55,8	54,8	70,5	
0,01mg E.	8,5	9,0	9,0	10,5	22,0	39,0	38,5	
0,1 mg E.	13,5	11,5	18,0	19,5	27,5	48,5	54,0	
0,25mg E.	13,0	16,5	24,5	40,0	53,0	231,0	297,0	
0,4 mg E.	11,7	16,0	20,3	32,7	55,0	75,7	350,7	
0,5 mg E.	17,0	33,5	37,5	78,5	160,5	610	1135,0	
E.Plasma	15,5	20,0	18,5	61,0	151,0	330,0	506,0	
MW)*	14,9	18,5	23,7	40,8	71,5	174,3	317,4	

i. GLDH (mU / ml)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	0,05	0,10	0,09	0,20	0,30	0,37	0,40	
0,01mg E.	0	0,10	0,05	0,01	0,40	0,20	0,15	
0,1 mg E.	0,20	0,15	0,15	0,30	0,25	0,65	1,05	
0,25mg E.	0,15	0,40	0,10	0,70	1,15	0,90	1,15	
0,4 mg E.	0	0,03	0,13	0,30	0,70	0,70	1,30	
0,5 mg E.	0,05	0,20	0,10	0,55	0,65	6,10	15,45	
E.Plasma	0,35	0,25	0,40	0,45	0,55	0,90	0,55	
MW)*	0,11	0,18	0,15	0,37	0,57	1,40	2,86	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

j. Evans-Blue(Extinktionen)

Gruppe	5 min	-30	-60	-90	-120	-150	-180	min
Kontr.	0.137	0.163	0.173	0.175	0.178	0.182	0.187	
0,01mg E.	0.139	0.141	0.131	0.131	0.154	0.167	0.152	
0,1 mg E.	0.145	0.153	0.141	0.139	0.130	0.176	0.267	
0,25mgE.	0.152	0.149	0.150	0.172	0.178	0.196	0.225	
0,4 mg E.	0.147	0.147	0.148	0.174	0.194	0.213	0.230	
0,5 mg E.	0.183	0.174	0.192	0.202	0.241	0.298	0.354	
E.Plasma	0.201	0.198	0.209	0.223	0.219	0.234	0.276	
MW)*	0.158	0.161	0.163	0.174	0.183	0.209	0.242	

)* MW steht für den aus allen 7 Mittelwerten einer Zeitstufe gebildeten Mittelwert.

Mittelwerte der einzelnen Gruppen unterschiedlicher Endotoxinkonzentration (Werte bezogen auf Enzym-
austritt pro Leber in mU) :

1. Versuche ohne Tuscheanwendung

a. LDH

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	3730	8400	12830	19110
0,01 mg E.	8530	12000	14290	60085
0,1 mg E.	8260	11555	19825	54000
0,25 mg E.	2300	8325	22665	200375
0,5 mg E.	12300	15165	21220	143540
1 mg E.	2900	11610	74610	261100
E.-Plasma	13740	10610	28320	41875
Mittelwert	8600	13025	25065	98920

b. GPT

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	300	390	590	1400
0,01 mg E.	600	570	530	3920
0,1 mg E.	1200	1025	1230	3525
0,25 mg E.	350	630	960	16520
0,5 mg E.	450	1015	1140	10640
1 mg E.	350	855	8760	32340
E.-Plasma	900	1115	2065	4355
Mittelwert	765	860	1850	8165

c. GOT

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	70	1830	3150	4575
0,01 mg E.	1070	1470	2590	7445
0,1 mg E.	1700	2500	4410	8050
0,25 mg E.	1350	2160	4320	16870
0,5 mg E.	1825	2725	4060	20075
1 mg E.	950	3150	13800	37310
E.-Plasma	100	1845	5040	9650
Mittelwert	1200	2580	3005	14850

Die Mittelwerte am Ende der Tabellen sind aus den 7 Werten einer Zeitstufe gebildet worden.

Mittelwerte der einzelnen Gruppen unterschiedlicher Endotoxinkonzentration (Werte bezogen auf Enzym-
austritt pro Leber in mU) :

2. Versuche mit Tuscheanwendung

a. LDH

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	9600	15300	18140	34880
0,01 mg E.	4700	4725	10440	17010
0,1 mg E.	9350	12375	20000	21385
0,25 mg E.	10150	18090	30360	317840
0,4 mg E.	6530	12060	22800	95900
0,5 mg E.	13350	21465	137680	668850
E.-Plasma	4700	9180	138840	350280
Mittelwert	8380	13475	47975	186940

b. GPT

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	1125	1260	1560	3660
0,01 mg E.	300	180	320	700
0,1 mg E.	700	900	760	1330
0,25 mg E.	200	855	1120	16030
0,4 mg E.	570	670	1090	13280
0,5 mg E.	1000	1125	6840	48650
E.-Plasma	600	495	10520	31780
Mittelwert	695	870	2860	14790

c. GOT

Gruppe	5'	60'	120'	180'
Kontrolle	2300	2860	4460	4935
0,01 mg E.	850	810	1760	2695
0,1 mg E.	1350	1620	2200	3780
0,25 mg E.	1300	2205	4240	20790
0,4 mg E.	1170	1830	4400	24550
0,5 mg E.	1700	3375	12840	79450
E.-Plasma	1550	1665	12080	35420
Mittelwert	1495	2135	5720	22215

Die Mittelwerte am Ende der Tabellen sind aus den 7 Werten einer Zeitstufe gebildet worden.

Legenden zu den Abbildungen der 3. Versuchsreihe

Es handelt sich bei allen Abbildungen um Mittelwertskurven. Die zugrunde liegenden Werte finden sich in den Tabellen von S. 80 bis S. 89 .

Dargestellt sind in den Abbildungen 18 - 22 jeweils die 8 Gruppen, die auch in die 4 faktorielle Varianzanalyse aufgenommen worden sind.

Es handelt sich dabei um folgende Gruppen :

- | | | | | |
|--|---|---|---|---|
| 1. Kontrollgruppe (ohne Endotoxin) ohne u.mit Tusche | | | | |
| 2. Gruppe mit 0,1mg Endotoxin | " | " | " | " |
| 3. Gruppe mit 0,25 mg Endotoxin | " | " | " | " |
| 4. Gruppe mit 10 ml E.-Plasma | " | " | " | " |

Erläuterungen zu den Abb. 16 - 23

Abb. 16a : Änderungen der Glukosekonzentration im Perfusat (Vers. ohne Tusche) . Der 60-min-Wert ist gleich Null gesetzt .
Abszisse : min nach Endotoxinzugabe
(0 min = 60 min nach Perfusionsbeginn).

Abb. 16b : Wie Abb. 16a, jedoch für Vers. mit Tusche

Abb. 17a : Abnahme der Gallensekretion während der Perfusion. Versuche ohne Tusche. Der 60-min-Wert ist gleich Null gesetzt .
Abszisse : min nach Endotoxinzugabe
(0 min = 60 min nach Perfusionsbeginn).

Abb. 17b : Wie Abb.17a, jedoch für Vers. mit Tusche

Abb. 18a : Abnahme der BSP-Konzentration im Perfusat. Versuche ohne Tusche. Abszisse : Zeit in Minuten. Ordinate : Extinktion Photometer Eppendorf.

Abb. 18b : Wie Abb. 18a, jedoch für Vers.mit Tusche

Abb. 19a : Änderungen der Kaliumkonzentrationen im Perfusionsmedium in mval / l .
Versuche ohne Tusche.

Abb. 19b : Wie Abb. 19a, jedoch für Vers.mit Tusche

Abb. 20a : LDH-Enzymaustritt während der Perfusion in mU / ml . Versuche ohne Tusche.

Abb. 20b : Wie Abb. 20a, jedoch für Vers.mit Tusche

Abb. 21a : Änderungen der GPT-Enzymaktivitäten im
Perfusionsmedium in mU / ml .
Versuche ohne Tuscheanwendung.

Abb. 21b : Wie Abb. 21a, jedoch für Vers.mit Tusche

Abb. 22a : Änderungen der GOT-Enzymaktivitäten im
Perfusionsmedium in mU / ml .
Versuche ohne Tuscheanwendung.

Abb. 22b : Wie Abb. 22a, jedoch für Vers. mit Tusche

Abb. 23a : LDH-Enzymaustritt in mU / ml :

o : Mittelwertskurve der 12 Versuche der
4 faktoriellen VA ohne Tuscheanwendung

m : Mittelwertskurve der 12 Versuche der
4 faktoriellen VA mit Tuscheanwendung

o' : Mittelwertskurve der 24 Versuche der
3 faktoriellen VA ohne Tuscheanwendung

m' : Mittelwertskurve der 17 Versuche der
3 faktoriellen VA mit Tuscheanwendung

Abb. 23b : GPT-Enzymaustritt in mU / ml -
Zeichenerklärung wie Abb. 23a.

Abb. 23c : GOT-Enzymaustritt in mU / ml -
Zeichenerklärung wie Abb. 23a.

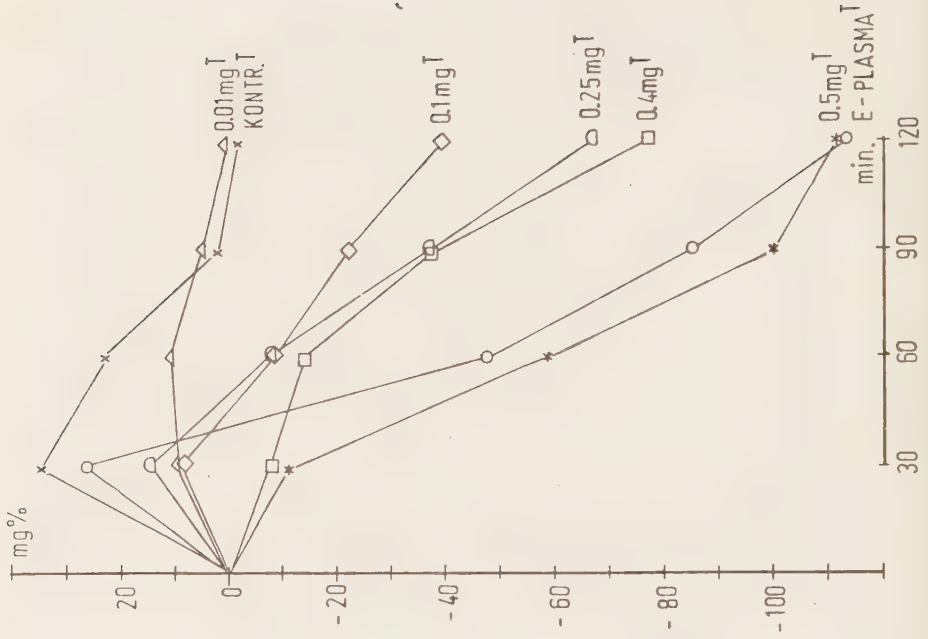
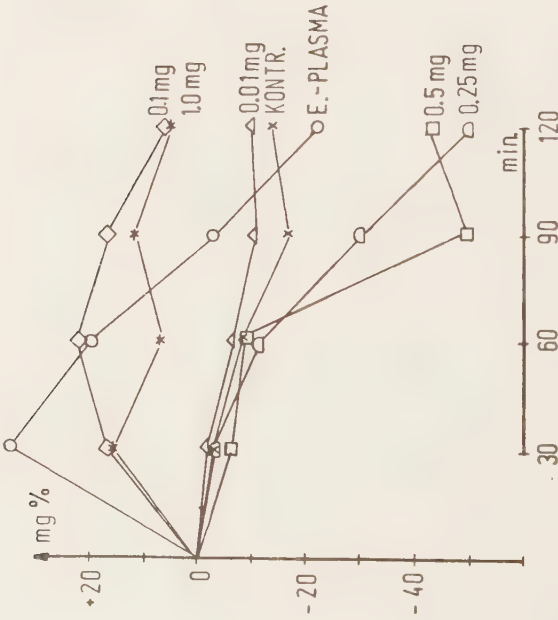


Abb. 16a (oben) : Änderungen der Glukosekonzentrationen im Perfusat. Versuche ohne Tusche. Der 60-min-Wert ist gleich Null gesetzt. Abszisse : min nach Endotoxinzugabe (0 min = 60 min nach Perfusionsbeginn) .

Abb. 16b (rechts) : Wie Abb. 16a , jedoch für die Versuche mit Tusche.



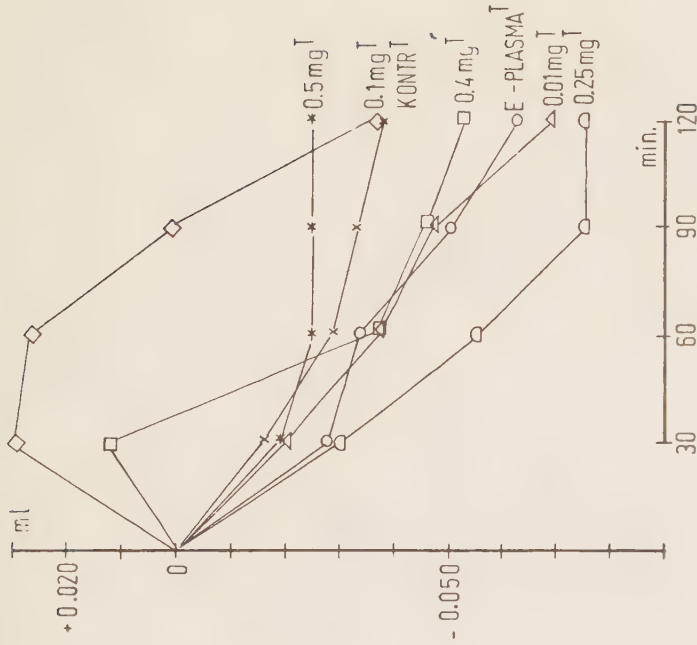


Abb. 17 b : Abnahme der Gallensekretion während der Perfusion. Versuche mit Tusche. Abszisse: min nach Endotoxinzugabe.

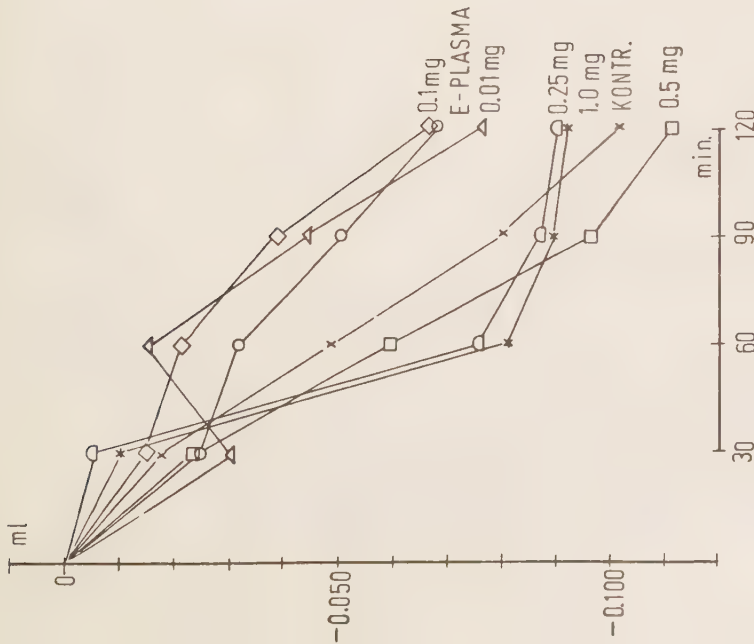


Abb. 17a (oben) : Abnahme der Gallensekretion während der Perfusion. Versuche ohne Tuscheanwendung, Abszisse: min nach Endotoxinzugabe.

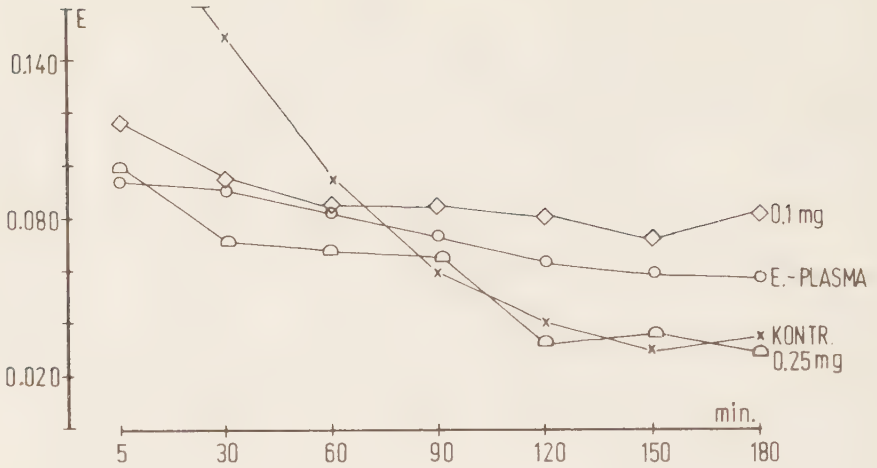


Abb. 18a : Abnahme der BSP-Konzentrationen im Perfusat. Versuche ohne Tusche. Ordinate : Extinktion Photometer Eppendorf .

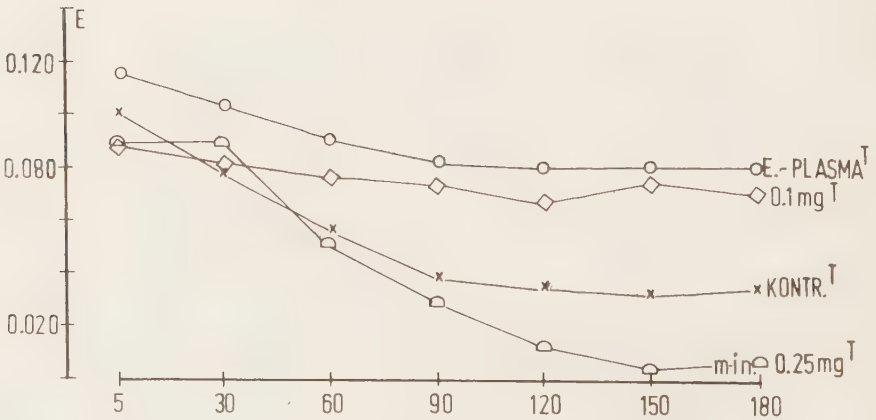


Abb. 18b : Abnahme der BSP-Konzentration im Perfusat. Versuche mit Tusche. Ordinate : Extinktion Photometer Eppendorf .

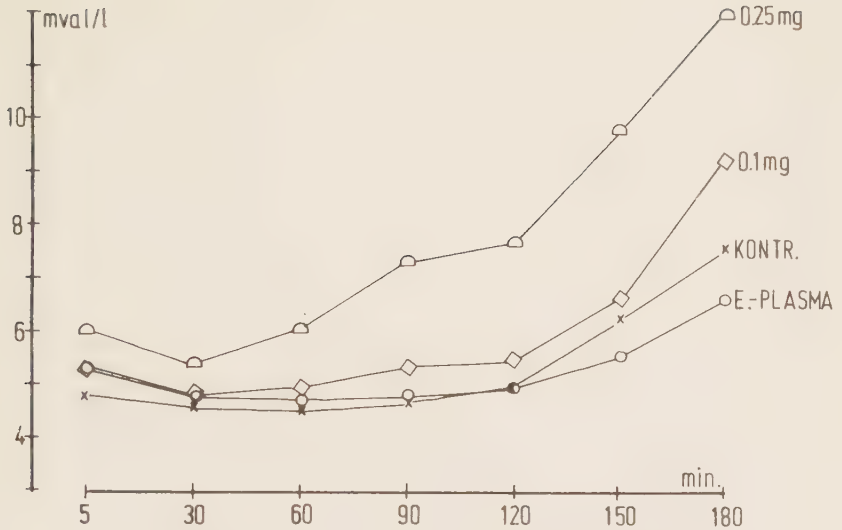


Abb. 19a : Änderungen der Kaliumkonzentration im Perfusionsmedium in mval / l . Versuche ohne Tusche .

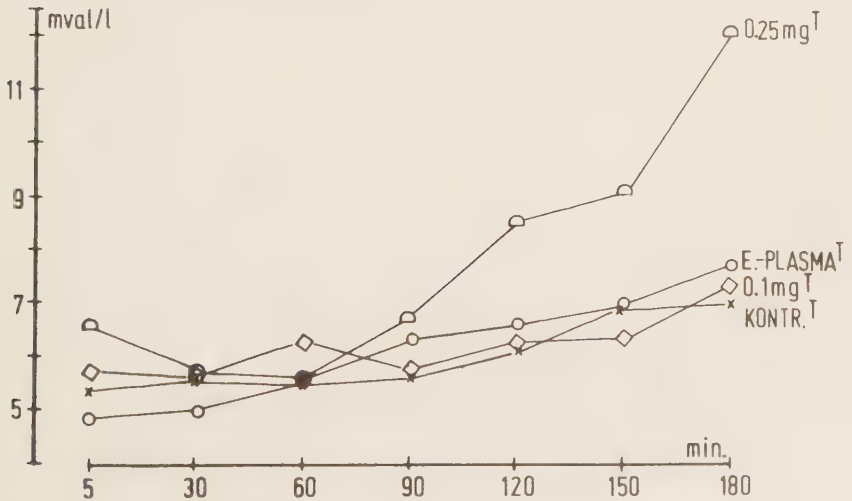


Abb. 19b : Änderungen der Kaliumkonzentration im Perfusionsmedium in mval / l . Versuche mit Tuschezugabe .

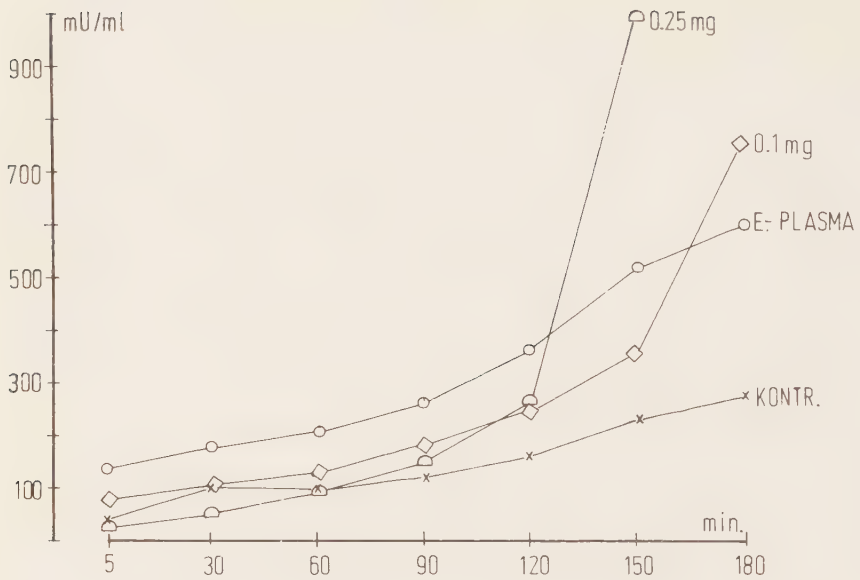


Abb. 20a : LDH - Enzymaustritt in mU / ml . Darstellung der Versuche ohne Tuscheanwendung..

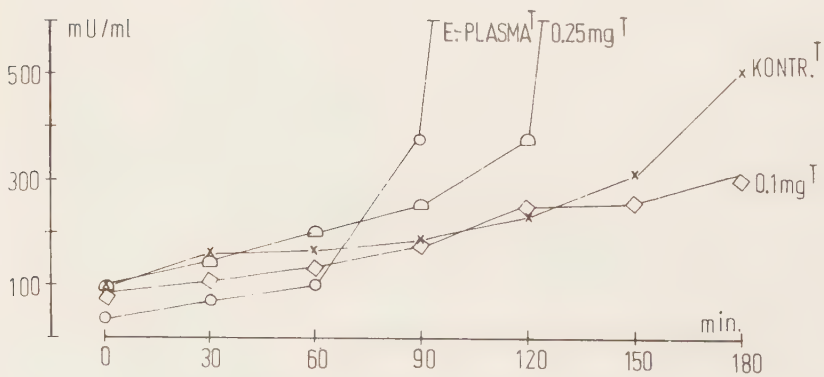


Abb. 20b : LDH - Enzymaustritt in mU / ml. Darstellung der Versuche mit Tuscheanwendung .

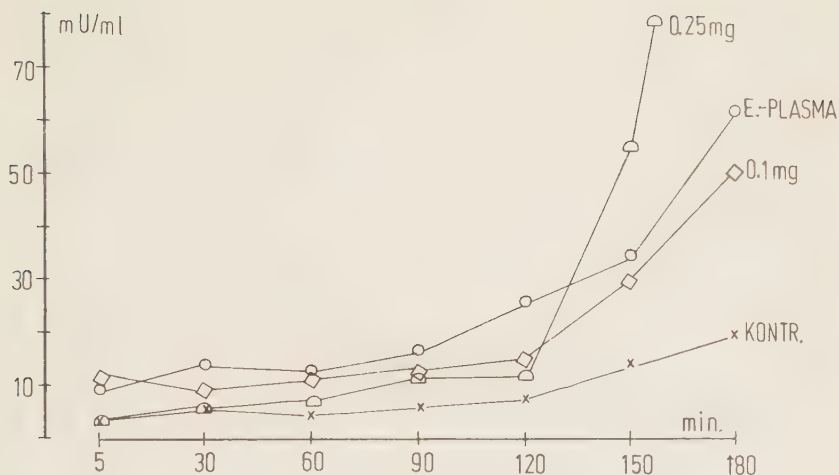


Abb. 21a : GPT - Enzymaustritt in mU / ml. Darstellung der Versuche ohne Tuscheanwendung .

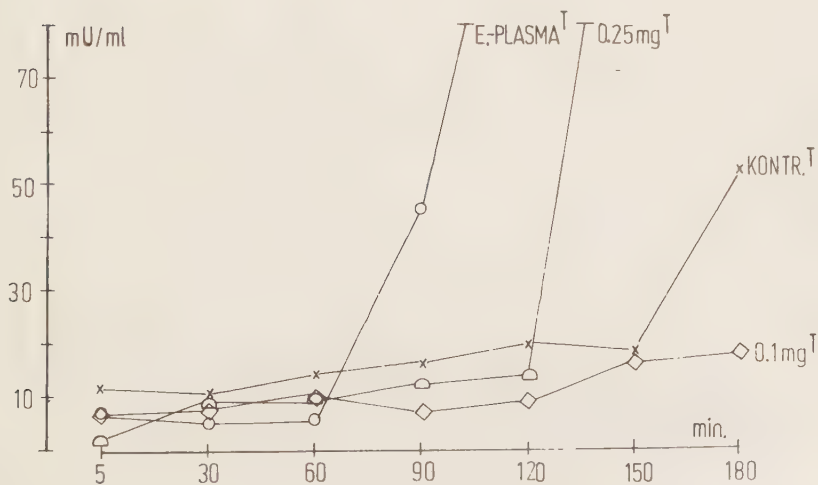


Abb. 21b : GPT - Enzymaustritt in mU / ml . Darstellung der Versuche mit Tuscheanwendung.

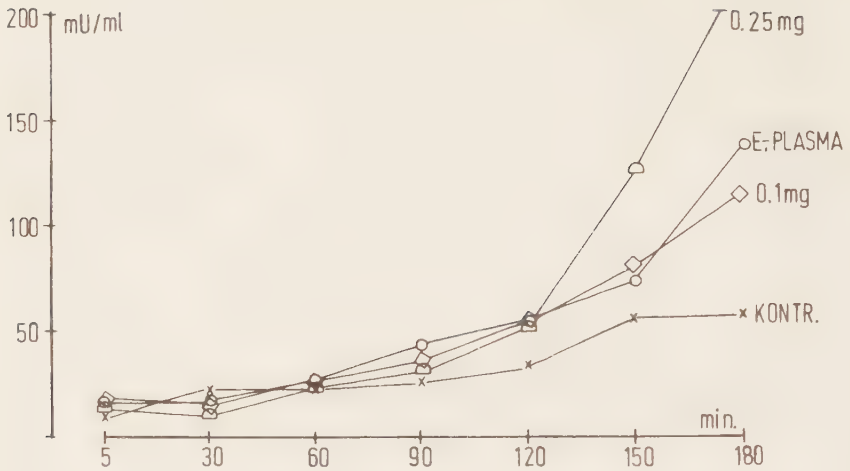


Abb. 22a : GOT - Enzymaustritt in mU / ml . Darstellung der Versuche ohne Tuscheanwendung.

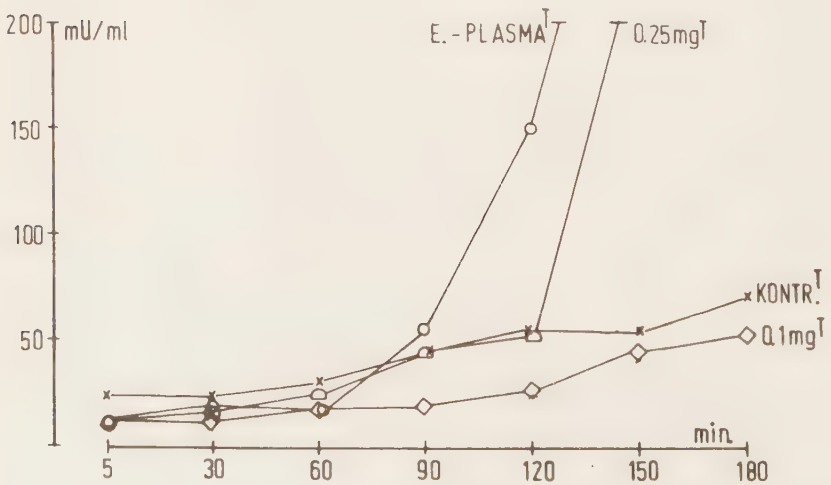


Abb. 22b : GOT - Enzymaustritt in mU / ml . Darstellung der Versuche mit Tuscheanwendung .

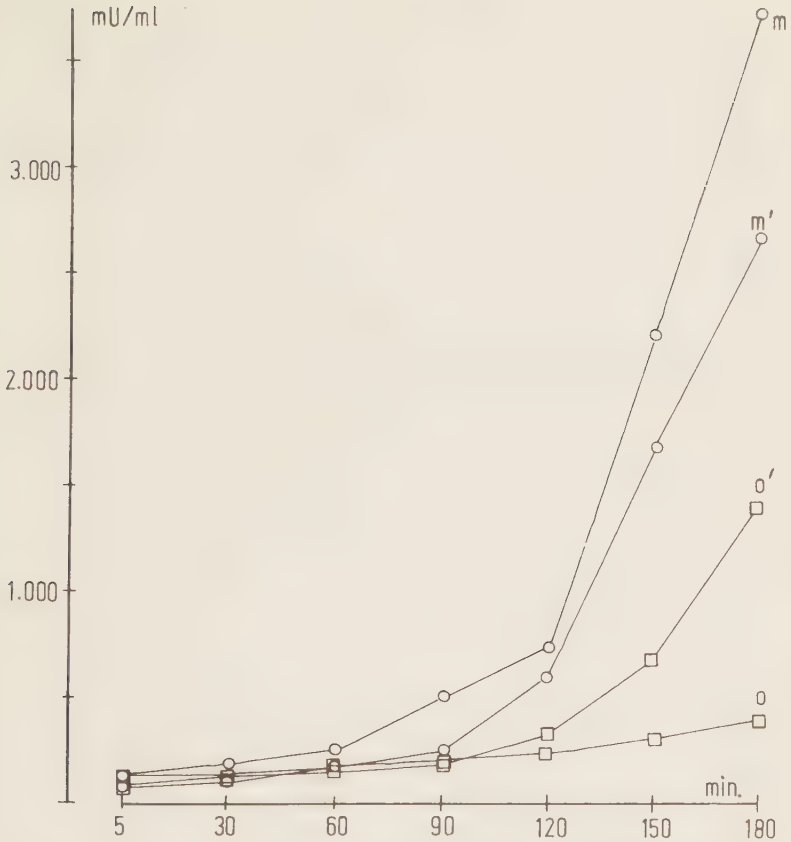


Abb. 23 a - c : Unterschiede in den Enzymaustritten in Abhängigkeit von der vorherigen Tuscheapplikation. o und o' = Versuche ohne Tusche, m und m' = Versuche mit Tusche .

- o : Mittelwertskurve aus den 12 Versuchen der 4 faktoriellen VA ohne Tusche
- m : Mittelwertskurve aus den 12 Versuchen der 4 faktoriellen VA mit Tusche
- o' : Mittelwertskurve aus den 24 Versuchen der 3 faktoriellen VA ohne Tusche
- m' : Mittelwertskurve aus den 17 Versuchen der 3 faktoriellen VA mit Tusche

Abb. 23a : LDH - Enzymaustritt in mU / ml (oben) .

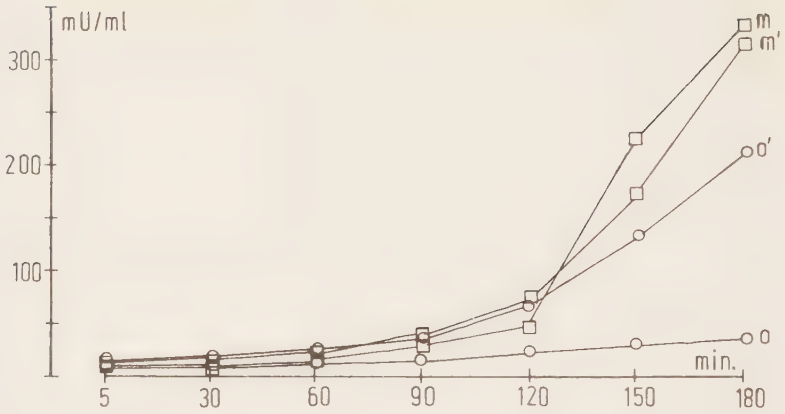


Abb. 23b : Wie Abb. 23a, jedoch für GPT - Enzymaustritt.

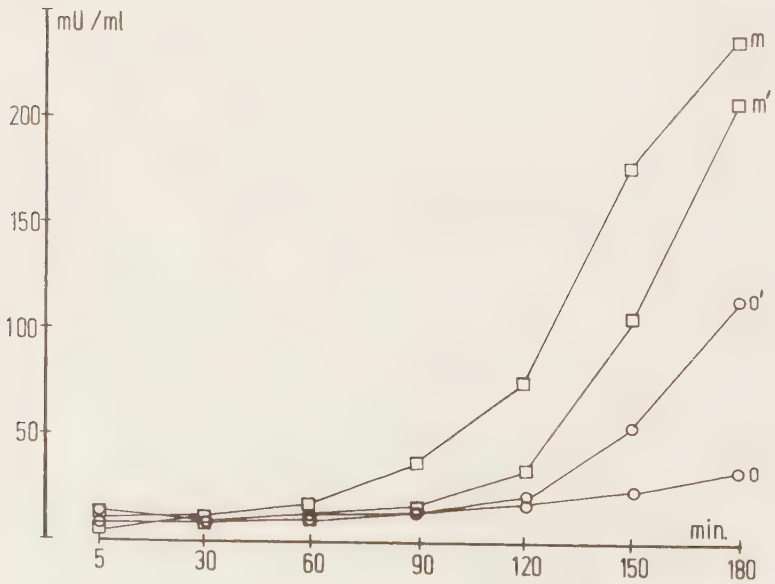


Abb. 23c : Wie Abb. 23a, jedoch für GOT - Enzymaustritt.

E. Anhang zur statistischen Auswertung

I. Berechnung der Standardabweichung σ für den Enzym- austritt in der ersten Stunde :

1. Berechnung des Mittelwertes M :

$$M = \sum \frac{\text{Während der 1.std freigesetztes Enzym}}{\text{Zahl der Versuche (n)}}$$

Unter Anwendung dieser Formel ergeben sich die folgenden Mittelwerte :

$$M_{LDH} = 95,30 \text{ mU} / 1.\text{std}$$

$$M_{GPT} = 4,17 \text{ mU} / 1.\text{std}$$

$$M_{GOT} = 15,00 \text{ mU} / 1.\text{std}$$

2. Berechnung der Standardabweichung σ :

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum x^2}{n - 1}}$$

x = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert
n = Zahl der Versuche

	$\sum x^2$	n-1	σ^2	σ	2 σ
LDH	1102804 mU	70 =	15754	125,5	251
GPT	8232 mU	70 =	117,6	10,8	21,6
GOT	22332 mU	70 =	319	17,9	35,8

Alle Versuche mit Enzymaustritten in der 1. std > 2 σ wurden wegen Verdachtes operationsbedingter Schädigungen eliminiert (insgesamt 9 Versuche). Hierbei war die LDH in 6 Fällen um mehr als die doppelte Standardabweichung erhöht, in 1 Fall extrem erniedrigt, und die GPT in 4 Fällen um mehr als 2 σ erhöht sowie in einem 5. Versuch genau am Grenzwert. Die GOT war bei diesen 9 Experimenten insgesamt 6 x oberhalb der doppelten Standardabweichung, in 4 anderen Versuchen an der Grenze und in einem weiteren Fall erheblich erniedrigt.

II. Durchführung der Scheffé - Tests

Im folgenden Teil dieser Arbeit werden die im F-Test der 3 faktoriellen Varianzanalyse signifikant gewordenen Parameter dem Scheffé - Test unterzogen.

Dadurch sollen die signifikant gewordenen Gruppen und der Zeitpunkt des Signifikanzeintrittes ermittelt werden.

Aus dem Kurvenverlauf in den graphischen Darstellungen (Abb. 16 a u. b - 22 a u. b) geht hervor, daß die Abweichungen der einzelnen Gruppen von den Werten der Kontrollgruppen gegen Ende der Perfusion am größten werden. Daher begnügen wir uns hier mit einem Mittelwertsvergleich der 150- und 180-min-Werte.

In die Mittelwertstabellen wurden nur die 3 bis 4 am stärksten vom Kontrollwert abweichenden Mittelwerte einbezogen. Wenn der Scheffé - Test überhaupt signifikant wird, dann hier.

1. Prinzip des Scheffé - Testes :

Ein aus der Mittelwertstabelle hervorgehender Wert L wird verglichen mit der Differenz d . Ist $L \leq d$, so liegt keine Signifikanz vor, d.h. die zu vergleichenden Kurven können zu diesem Zeitpunkt noch als parallel zueinander angesehen werden.

Ist $L > d$, so wird der Test signifikant, d.h. der Abstand zwischen den verglichenen Punkten ist nicht mehr als zufällig zu betrachten.

War der F- Test signifikant und bleibt trotzdem im Scheffé - Test überall $L \leq d$, so muß der höchste im Vergleich vorkommende Mittelwert als Grund für die Signifikanz angenommen werden. Ursache hierfür ist die relativ große Bandbreite des Scheffé - Testes nach oben.

Während der Wert für L einfach aus der Mittelwertstabelle entnommen werden kann, muß d errechnet werden.

Es gilt die Beziehung :

$$d = \sqrt{s^2 \cdot \sigma^2}, \text{ wobei}$$

$$s^2 = (k - 1) \cdot F_{1-\alpha; k-1; f}$$

k = Anzahl aller im Vergleich auftretender Mittelwerte (7 Zeitstufen, 7 Gruppen: also : $7 \cdot 7 = 49$ Mittelwerte)

f = MAQ_{Rest} - Freiheitsgrad (S. VA-Tabelle)

für die Vers. ohne Tusche: f = 102
" " " " mit " : f = 60

F = F-Wert (Tab. aus (65))

für Vers. ohne Tusche: F = 1,48 ($\alpha = 5\%$)

für Vers. mit Tusche: F = 1,56 ($\alpha = 5\%$)

α = Irrtumswahrscheinlichkeit

$$\sigma^2 = MAQ_{\text{Rest}} \cdot \sum \frac{c_j^2}{n_j}$$

n_j = Anzahl der Meßwerte, aus denen der j-te Mittelwert im Vergleich berechnet worden ist (Je nach Gruppengröße zwischen 2 und 5).

c_j = Faktor, der beim j-ten Mittelwert im Vergleich steht (= Zeitstufe - 1).

2. Anwendung des Testes auf die Kalium- und GPT-Werte der Versuche ohne Tusche (150- und 180-min-Werte).

a. Berechnung von d

Für $\alpha = 5\%$ gilt :

$$d = \sqrt{48 \cdot 1,48 \cdot MAQ_{\text{Rest}} \cdot \sum \frac{c_j^2}{n_j}}$$

MAQ_{Rest} (Kalium) = 14171

MAQ_{Rest} (GPT) : 3777

$$\sum \frac{c_j^2}{n_j} = 0,73 \text{ für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit } 0,5 \text{ mg Endotoxinzugabe (Kontr.-gruppe : 3 Vers., } 0,5 \text{ mg Endotoxingruppe : 4 Versuche)}$$

= 0,91 für Kontrollgruppe (3 Vers.) und Gruppe mit 0,25 mg Endotoxin bzw. Gruppe mit 1,0 mg Endotoxinzugabe (beide je 2 Versuche) .

	Kalium	GPT
0,25 mg Endotoxingruppe :	915	467
0,5 mg Endotoxingruppe :	765	391
1,0 mg Endotoxingruppe :	915	467

Tabelle der d-Werte ($\alpha=5\%$)

b. Mittelwertstabellen für L

Mittelwertstabelle für Kalium (Vers. ohne Tusche)

180-min-Werte

		1075	1213
Kontrollversuche	758	317	455*
Vers. mit 1,0 mg E.	1075	-	138
Vers. mit 0,25mg E.	1213		-

150-min-Werte

		900	945	983
Kontrollversuche	623	272	317	355
Vers. mit 0,1 mg E.	900	-	45	83
Vers. mit 1,0 mg E.	945		-	33

Mittelwertstabelle für GPT (Vers.ohne Tusche)

180-min-Werte

		152	236	462
Kontrollversuche	20	132	216	442*
Versuche mit 0,5 mg E.	152	-	84	310
Versuche mit 0,25 mg E.	236		-	226
Versuche mit 1 mg E.	462			-

150-min-Werte

		56	57	273
Kontrollversuche	13	43	44	260
Versuche mit 0,25 mg E.	56	-	1	217
Versuche mit 0,5 mg E.	57		-	216
Versuche mit 1,0 mg E.	273			-

Die signifikanten Mittelwerte sind in den Tabellen mit * gekennzeichnet ($\alpha = 5\%$)

Ergebnis für die Kalium- und GPT-Werte der Versuche ohne Tusche

Sämtliche 150-min-Werte sind nicht signifikant, d.h. der Abstand der einzelnen Kurven kann zu allen Zeitpunkten bis einschließlich des 150-min-Wertes und bei allen Gruppen noch als zufällig bezeichnet werden.

Bei den 180-min-Werten ist im Falle des Kaliums nur der letzte Wert (3-h-Wert) in der Gruppe mit 0,25 mg Endotoxinzugabe und bei den GPT-Werten nur der letzte Wert in der Gruppe mit 1 mg Endotoxinzugabe signifikant ($\alpha = 5\%$) .

Die Berechnungen für Irrtumswahrscheinlichkeiten von nur 1 % ergaben in keinem Fall signifikante Abweichungen von den Kontrollgruppen.

3. Anwendung des Scheffé - Testes für die Kalium-, LDH-, GPT- und GOT-Werte der Versuche mit Tusche (150-min- und 180-min-Werte).

a. Berechnung von d

Für $\alpha = 5 \%$ gilt :

$$d = \sqrt{48 \cdot 1,56 \cdot \text{MAQ}_{\text{Rest}} \cdot \sum \frac{c_j^2}{n_j}}$$

$$\text{MAQ}_{\text{Rest}} (\text{Kalium}) = 9888$$

$$\text{MAQ}_{\text{Rest}} (\text{LDH}) = 1298193$$

$$\text{MAQ}_{\text{Rest}} (\text{GPT}) = 8494$$

$$\text{MAQ}_{\text{Rest}} (\text{GOT}) = 17974$$

$$\sum \frac{c_j^2}{n_j} = 0,76 \quad \text{Für Kontrollgruppe (4 Vers.) und Gruppe mit 0,4 mg Endotoxinzugabe}$$

$$= 0,87 \quad \text{Für Kontrollgruppe und die Gruppen mit 0,25 mg, 0,5 mg, Endotoxinzugabe und die E.-Plasmagruppe (je 2 Vers.)}$$

	Kalium	LDH	GPT	GOT
0,4 mg E.-Gruppe	661	7460	605	880
0,25 mg-, 0,5 mg-, E.-Plasmagruppen	756	8555	693	1090

Tabelle der d-Werte ($\alpha = 5 \%$)

b. Mittelwertstabellen für L

Mittelwertstabelle für Kalium (Vers.mit Tusche)
180-min-Werte

		1080	1180	1202
Kontrollgruppe	687	392	492	514*
Vers. mit 0,4 mg E.	1080	-	100	122
Vers. mit 0,5 mg E.	1180		-	22
Vers. mit 0,25 mg E.	1202			-

150-min-Werte

		903	960	1058
Kontrollgruppe	687	215	272	380
Vers. mit 0,25 mg E.	903	-	58	155
Vers. mit 0,5 mg E.	960		-	97

Mittelwertstabelle für LDH (Vers. mit Tusche)

180-min-Werte

		1370	4541	5004	9555
Kontrollgruppe	498	872	4043	4506	9057*
Vers. mit 0,4 mg E.	1370	-	3171	3634	8185
Vers. mit 0,25 mg E.	4541		-	463	5014
Vers. mit E.-Plasma	5004			-	4551
Vers. mit 0,5 mg E.	9555				-

150-min-Werte

		413	2042	3508	7065
Kontrollgruppe	302	111	1740	3206	6763
Vers. mit 0,4 mg E.	413	-	1629	3095	6652
Vers. mit 0,25 mg E.	2042		-	1466	5023
Vers. mit E.-Plasma	3508			-	3557

Mittelwertstabelle für GPT (Vers. mit Tusche)

180-min-Werte

		190	230	454	695
Kontrollgruppe	52	138	178	402	643*
Vers. mit 0,4 mg E.	190	-	12	212	505
Vers. mit 0,25 mg E.	230		-	224	465
Vers. mit E.-Plasma	454			-	239
Vers. mit 0,5 mg E.	695				-

150-min-Werte

		38	143	282	395
Kontrollgruppe	18	20	125	264	377
Vers. mit 0,4 mg E.	38	-	105	244	357
Vers. mit 0,25 mg E.	143		-	139	252
Vers. mit E.-Plasma	282			-	113

Mittelwertstabelle für GOT (Vers. mit Tusche)

180-min-Werte

		192	297	506	1135
Kontrollgruppe	71	121	226	435	1064*
Vers.mit 0,4 mg E.	192	-	105	314	943
Vers.mit 0,25 mg E.	297		-	209	838
Vers. mit E.-Plasma	506			-	629
Vers. mit 0,5 mg E.	1135				-

150-min-Werte

		90	231	330	610
Kontrollgruppe	55	35	176	275	555
Vers. mit 0,4 mg E.	90	-	141	240	520
Vers. mit 0,25 mg E.	231		-	99	379
Vers. mit E.-Plasma	330			-	280

Die signifikanten Mittelwerte sind in den Tabellen mit * gekennzeichnet ($\alpha = 5\%$).

Ergebnis für die Kalium-, LDH-, GPT- und GOT-Werte bei den Versuchen mit Tuscheanwendung

Wie bereits bei den Werten für die Versuche ohne Tuscheanwendung sind auch hier die 150-min-Werte durchwegs nicht signifikant.

Bei den 180-min-Werten tritt eine Signifikanz nur jeweils bei der Gruppe mit 0,5 mg Endotoxinzugabe auf. Für Irrtumswahrscheinlichkeiten $\leq 5\%$ konnten auch hier in keinem Fall signifikante Ab-

weichungen von den Werten der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt - ebenso wie die des vorangegangenen Scheffé-Testes für die Kalium- und GPT-Werte der Versuche ohne Tusche - im Text, da die Scheffé - Tests ja nur eine Ergänzung zu den F-Tests der Varianzanalyse sein sollen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. LÜDERITZ, O. und O. WESTPHAL, Angew. Chemie 78, 172, (1966) .
2. BLADEN, H.A. and S.E. MERGENHAGEN, J. Bact. 88 , 1482 (1964) .
3. WESTPHAL, O., O. LÜDERITZ und F. BISTER , Z. Naturforschung, 7_b , 148 (1952) .
4. GALANOS, C., O. LÜDERITZ und O. WESTPHAL, Europ. J. Biochem. 2, 245 (1969) .
5. LÜDERITZ, O., K. JANN, und R. WHEAT, Compr. Biochem. 26 A , 105, (1968) .
6. LÜDERITZ, O., A.M. STAUB und O. WESTPHAL, Bacteriol. Rev. 30 , 192, (1966) .
7. KAUFFMANN, F., Die Bakteriologie der Salmonella Species, Munksgaard, Kopenhagen 1961
8. KAUFFMANN, F. , The Bacteriology of Enteriobacteriaceae, Munksgaard, Kopenhagen 1966, Sec. Ed.
9. FULLER, N., M.ETIEVANT und A.M. STAUB, European J. Biochem. 6 , 525, (1968) .
10. LÜDERITZ, O., Angew. Chemie 82 , 708 (1970) .
11. RIETSCHER, E.Th., Lipoid A als aktives Prinzip der Endotoxinwirkungen, Freiburg i.Br., Diss 1971 .
12. WESTPHAL, O., und O. LÜDERITZ, Angew. Chemie 66 , 407 (1954) .
13. SHEAR, M.J. and F.C. TURNER , J. Natl. Cancer Inst. 4 , 81, 107, 123 (1943) .
14. MILLES , A.A. and N.W. PIRIE, Biochem. J. 33 , 1716, (1939) .
15. TAL, C. and W.F. GOEBEL, J. Exptl. Med. 92 , 25 (1950) .
16. JESAITIS, M.A. and W.F. GOEBEL, J. Exptl. Med. 96 , 409 (1952) .
17. GMEINER, J., O. LÜDERITZ und O. WESTPHAL, Europ. J. Biochem. 7 , 370 (1969) .
18. SIMON, M., J. GMEINER, O. LÜDERITZ und O. WESTPHAL, in Vorbereitung (1971) .

19. DRÖGE, W., O. LÜDERITZ und O. WESTPHAL, Europ. J. Biochem. 14 , 175 (1970) .
20. LÜDERITZ, O., C. GALANOS, H.J. RISSE, E. RUSCHMANN, S. SCHLECHT, G. SCHMIDT, H. SCHULTE-HOLTHAUSEN, R. WHEAT, O. WESTPHAL und J. SCHLOSSHARDT, Ann. N.Y. Acad. Sci. 133 , 349 (1966) .
21. KIM, Y.B. and J. WATSON, J. Bact. 94 , 1320 , (1967) .
22. KASAI, N. and A. NOWOTNY, J. Bacteriol. 94 , 1824 , (1967) .
23. NOWOTNY, A. , Nature 197 , 721 (1963) .
24. TRIPODI, D. and A. NOWOTNY, Ann.N.Y. Acad. Sci. 133 , 604 (1966) .
25. MCINTIRE, F., H.W. SIEVERT, G.H. BARLOW, R.A. FINLEY and A.Y. LEE, Biochem. 6 , 2363 (1967) .
26. MALCHOW, D., O. LÜDERITZ, B. KICKHOFEN und O. WESTPHAL, Europ. J. Biochem. 7 , 239 (1969) .
27. NIGAM, V.N., D. MALCHOW, E. Th. RIETSCHEL, O. LÜDERITZ, und O.WESTPHAL, Hoppe Seyler's Z. phys. Chemie 351 , 1123 , (1970) .
28. NOWOTNY, A. Bacteriol. Rev. 33 , 72 (1969) .
29. CUNDY, K.R. and A. NOWOTNY, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 127 , 999 (1968) .
30. LANDY, M. and W. BRAUN (ed.), Bacterial Endotoxins, Rutgers University Press, New Brunswick, N.J. (1964) ,
31. KIM, Y.B. and D.W. WATSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 133 , 727 (1966) .
32. ATKINS, E., Phys. Review 40 , 3 (1960) .
33. KAISER, H.K. and W.B. WOOD, Jr., J. Exptl. Med. 155 , 27 (1962) .
34. RUBENSTEIN, H.S., J. FINE, and A.H. COONS, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 111 , 458 (1962) .
35. KANOK, S., H. KAWASAKI, M. YOSHIDA, A. NISHIO and K. MOCHIDA, Japan. J. Pharmacol. 17 , 125 (1967) .
36. RAUEN, H. M. , Narkose bei kleinen Tieren, Biochemisches Taschenbuch, Springer Vlg. 1964 .
37. MILLER, L.L. , and M. L. WATSON, J. Exptl. Med 94 , 431 (1951) .
38. SCHIMASSEK, H. , Biochem. Ztschr. 336 , 460 (1963) .

38. SCHIMASSEK, H., Biochem. Ztschr. 336 , 460 ,
(1963) .
39. RAUEN, H.M., Tissue preparations in vitro, Medio for
the incubation of animal tissues, Biochem. Taschen-
buch, Springer Vlg., 1964, S. 523 .
40. BERGMAYER, H.U., E. Bernt : D- Glucose : Verfahren
mit 2.2' Azino-di- (3-äthylbenzthiazolon) - 6'-sul-
fonat, Methoden d.enzym. Analyse, Vlg. Chemie ,
S. 1179.
41. RICHTERICH, R., Komplexe Funktionsproben, Klin. Che-
mie , Akadem. Vlgsgesellsch.,Ffm. 1968 .
42. BERGMAYER, H.U., BERNT, E. , LDH ; UV- Test mit
Pyruvat und NADH, Meth.d.enzym. Analyse, Vlg. Chemie,
S. 533 .
43. BERGMAYER, H.U., BERNT, E., GOT ; UV-Test mit Malat-
Dehydrogenase als Indikatorenzym, Meth.d.enzym.
Analyse, Vlg. Chemie, S. 685 .
44. BERGMAYER, H.U., BERNT, E., GPT ; UV-Test mit LDH
als Indikatorenzym, Meth.d.enzym.Analyse, Vlg.
Chemie, S. 717.
45. SCHMIDT, E., GlDH; UV- Test , Meth.d.enzym.Analyse,
Vlg. Chemie S. 607 .
46. BROWNEE, K.A., Statistical Theory and Methodology ,
(1965) .
47. WINER, B.J., Statistical Principles in Experimental
Design (1962) .
48. SCHEFFE, H. , The Analysis of Variance , (1959) .
49. BEHNKE, H., H. TIETZ , Fischer Lexikon, Mathe-
matik 2, S. 328 , Fischer Bücherei 29/2,(1966).
50. Minnesota Mining & Manufacturing Company mbH (Hrsg.),
Chem. Produkte, Inerte Fluorchemikalie FC-75,
Information, Teil 2, Blatt 3,Okt. 1966 .
51. SLOVITER, H.A., T. KAMIMOTO, Nature 216 , 458 ,
1967 .
52. GEYER, R.P., R.G. MONROE, K. TAYLOR, Survival of rats
totally perfused with a fluorocarbon-detergent pre-
paration. In : Organ Perfusion and Preservation,
Chapter 3, pp. 35 - 96, Ed. by NORMAN, J.C. et al.
New York, 1968 .

53. GEYER, R.P. Medizin u. Ernährung, 256, 11.Jg.,
(1970) .
54. HAAS, H. und S. FETZER, Anatom. Anzeiger 128 ,
319, 1971 (Ergänzungsheft) .
55. MIERTSCH, H.J., Diss. Gießen 1973, bisher unveröffentl.,
Z.T. in Ztschr.f.Klin.Chem.u.Arzneimittelforschg.,
(Drug Res.), 22 - 1103 - 1109 (1972) .
56. SAUER, H.-J., Diss. Gießen , 1970 , 35 S.
57. SWENSON, O., L. GRANA, T. INOUE, W.L. DONNELLAN,
Arch. of Surgery, Vol. 95 , 451, (1967) .
58. ROSS, D., Diss. Ffm. 1967. 46 S.
59. ZIMMERMANN, H., Path. Anat. 138 , 209 (1968) .
60. CARROLL, R., J. Path. and Bact., 85 , 67,
(1963) .
61. SCHNEIDER, M., Thoraxchir. 6 , 95, (1958) .
62. BASSI, M., A. BERNELLI- ZAZZERA, E. CASSI, J. of
Path. and Bact. 79 , 179 , (1960) .
63. Van WYK, J., I. TAIT, B. EISEMAN, Surgery 58 ,
374 , (1965) .
64. RIETSCHEL, E. Th., Chemical and Biological Investi-
gations on Endotoxins (Lipopolysaccharides) of
Salmonella R - Mutants, Liège, Jan. 15 , 1971 .
65. SNEDECOR, G.W., Statistical Methods, Iowa State
College Press, Iowa 1948, S. 222.
66. FRIMMER, M. und W. KREH, Naunyn-Schmiedeberg's Arch.
Pharmak. 268, 119-121, 1971 .
67. FRIMMER, M. und R. KRAMER , Z.ges.exp.Med. 152,
269 - 273, 1970 .
68. HÖPER, J., KESSLER, M., and STARLINGER, H., In :
Oxygen Transport to Tissue. Ed. by H.I. Bicher
and D.F. Bruley. Plenum Publishing Corp. 37 A,
371 - 375 , 1973 .
69. KESSLER, M., HÖPER, J., SIMON, W : 58th Annual
FASEB Meeting, April 7 - 12, 1974, Atlantic City N.J.
70. KESSLER, M., HÖPER, J., SCHÄFER, D., STARLINGER, H.:
Sauerstofftransport im Gewebe, In: Schriften-
reihe Anästhesiologie u. Intensivtherapie,
Bd. 5, Mikrozirkulation. Hrsg.: Ahnefeld, F.W. et al.

71. KESSLER, M. : Normale und kritische Sauerstoffversorgung der Leber bei Normo- und Hypothermie. Habilitationsschrift Marburg (Lahn), 1967 .
72. KESSLER, M., and SCHMELING, D.: Pflügers Arch. Sup. 343, 128 , 1973
73. STAIB, W., SCHOLZ, R.: Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber, Berlin 1968, S. 15 ff .

Lebenslauf

Am 23.5.1950 wurde ich in Haiger / Dillkreis geboren als zweiter Sohn des Pfarrers Theodor Alfred Aschoff und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Müller. 1956 wurde ich in der Elly-Heuss-Knapp-Schule in Darmstadt eingeschult. 1960 wechselte ich auf das Darmstädter Ludwig-Georg-Gymnasium über, wo ich im Sommer 1968 das Abitur bestand. Im Herbst des gleichen Jahres nahm ich das Medizinstudium an der Justus Liebig-Universität in Gießen auf. 1969 legte ich dort das Vorphysikum ab und im Frühjahr 1971 bestand ich an derselben Universität das Physikum. In den Jahren 1971 und 1972 entstand die vorliegende Arbeit am Institut für Klinische Chemie der Justus Liebig-Universität . Mein medizinisches Staatsexamen habe ich in Gießen am 10.Juli 1974 abgeschlossen.

